

**Untersuchungen zum Induktionsmechanismus der
lichtregulierten Carotinoidsynthese bei
*Fusarium aquaeductuum***

Marianne Jochum

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549006_0012

Untersuchungen zum Induktionsmechanismus der
lichtregulierten Carotinoidsynthese bei
Fusarium aquaeductuum

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Marianne Jochum
aus Feldkirchen

September 1977



1. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 17.1.1978

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität
München auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Werner Rau

angefertigt.

Für die stets großzügige Förderung dieser
Arbeit, sowie für die hilfsbereite Anteil-
nahme auch an persönlichen Belangen, bin ich
Herrn Prof. Dr. W. Rau zu großem Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau U.Hof für die sorgfältige und gewissenhafte Assistenz bei einem Teil der Versuche.

Meinem Mann, Peter Jochum, danke ich sehr für die Durchführung der Computeranalyse an der TR 440 des Leibniz-Rechenzentrums der TU München.

Verwendete Abkürzungen

Butyl-PBD	2-(4-t-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,2,3-oxadiazol
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
FYG	Laborbezeichnung für eine halbsynthetische Nährflüssigkeit (Zusammensetzung siehe Material und allgemeine Methodik)
M	molar
MVA	Mevalonsäure
PG-Lösung	Puffer-Glukose-Lösung (1/30 M KH_2PO_4 ; 0,1 M Glukose)
m-RNS	messenger-RNS
s-RNS	soluble (lösliche)-RNS
t-RNS	Transfer-RNS
h-rRNS	schwere ribosomale RNS
l-rRNS	leichte ribosomale RNS
TB-RNS	"tenaciously bound" RNS
SAS	Natrium-4-aminosalicylat
SDS	Natriumlaurylsulfat
TGA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
μCi	Mikrocurie

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von größtmöglicher Reinheit.
Bezugsquellen für die wesentlichen der verwendeten Chemikalien:

Boehringer: Distamycin A-Hydrochlorid, Tubercidin,
RNS aus Hefe;

Calbiochem: Eserin;

Fluka: Cycloheximid, Rinderserumalbumin (Frakt.V);

Merck: Acetylcholinchlorid

Radiochemical Centre, Amersham: R,S-(2- ^{14}C)-MVA-Lacton,
U- ^{14}C -Uridin, U- ^{14}C -Leucin, G- ^3H -Leucin.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Material und allgemeine Methodik</u>	8
1. Anzucht von <i>Fusarium aquaeductuum</i>	8
2. Versuchsdurchführung	9
3. Extraktion und Messung der Carotinoide ("Gesamt- farbstoff")	9
4. Darstellung	10
<u>Versuche zur Beteiligung von Acetylcholin bei der Licht- induktion der Carotinoidsynthese</u>	11
1. Versuchsdurchführung	11
2. Ergebnisse	12
<u>Versuche zum Nachweis einer Beteiligung der Transkrip- tion am Mechanismus der Lichtinduktion der Carotinoid- synthese</u>	15
I. Die Wirkung von Hemmstoffen und Antimetaboliten der Transkription auf die Carotinoidsynthese	15
1. Die Wirksamkeit verschiedener Hemmstoffe und Antimetabolite	15
2. Die Wirkung von Distamycin	19
2.1. Konzentrationsabhängigkeit	20
2.2. Zeitabhängigkeit der Wirkung in Beziehung zur Photoinduktion	22
3. Die Wirkung von Tubercidin	23
3.1. Konzentrationsabhängigkeit	24
3.2. Zeitabhängigkeit der Wirkung in Beziehung zur Photoinduktion	26
3.3. Verhinderung der Hemmung durch Adenosin	27
4. Vergleich der Wirkung von Hemmstoffen der Trans- kription und Translation	28

II. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf die Nucleinsäure- und Proteinsynthese	31
1. Methoden	32
1.1. Versuchsdurchführung	32
1.2. Isolierung, Reinigung und quantitative Bestimmung der Nucleinsäuren	34
1.3. Radioaktivitätsmessung in isolierten Nucleinsäuren	38
1.4. MAK-Chromatographie der Nucleinsäuren	39
1.5. Extraktion und quantitative Bestimmung der löslichen Proteine	41
2. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf den Einbau von Uridin bzw. Leucin in das Mycel (TCA-unlösliches Material)	42
2.1. Vergleich von Aufnahme und Einbau in TCA-unlösliches Material	42
2.2. Die Wirkung von Distamycin	43
2.3. Die Wirkung von Tubercidin	45
2.4. Vergleich der Wirkung von Distamycin/Tubercidin und Cycloheximid	48
3. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf den Einbau von Uridin bzw. Leucin in isolierte Nucleinsäuren und Proteine	50
3.1. Störung der quantitativen Bestimmung von Nucleinsäuren durch SAS	51
3.2. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf die Gesamtnucleinsäuren	55
3.3. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf einzelne Nucleinsäurefraktionen	59

III. Die Wirkung von Hemmstoffen der Transkription und Translation auf die Synthesekinetik einzelner Carotinoide und anderer lipophiler Substanzen des Terpenoidsyntheseweges	61
1. Methoden	64
1.1. Verseifen des R,S-(2- ¹⁴ C)-Mevalonsäure-lactons	64
1.2. Versuchsansatz für die radioaktive Markierung der Carotinoide	64
1.3. Extraktion, Auftrennung und Identifizierung der Carotinoide und Sterine	65
1.3.1. Gewinnung des radioaktiv markierten Gesamtextraktes	65
1.3.2. Auftrennung des Gesamtextraktes durch Phasenverteilung	65
1.3.3. Verseifen der Epi- und Hypophase	66
1.3.4. Säulenchromatographische Trennung der Sterine und Carotinoide	66
1.3.5. Dünnschichtchromatographie	68
1.4. Radioaktivitätsbestimmung der markierten Substanzen	70
2. Ergebnisse	70
2.1. Einbau von ¹⁴ C-MVA in den lipophilen Extrakt	70
2.2. Verteilung des Einbaus von ¹⁴ C-MVA in die einzelnen Substanzen der nicht verseifbaren, lipophilen Fraktion	73
2.2.1. Einbau von ¹⁴ C-MVA in die lipophilen Substanzen der Hypophase	74
2.2.2. Einbau von ¹⁴ C-MVA in die lipophilen Substanzen der Epiphase	77

	Seite
2.3. Die Wirkung von Distamycin und Cyclo- heximid auf die Synthese der einzelnen Carotinoide	81
2.4. Identifizierung weiterer Carotinoide im Mycel von <i>Fusarium aquaeductuum</i>	85
<u>Diskussion</u>	88
<u>Zusammenfassung</u>	99
<u>Literaturverzeichnis</u>	102

Einleitung

Lichtabhängige biologische Prozesse, wie Photosynthese, Phototropismus und Photomorphogenese - um nur einige zu nennen - sind im Pflanzenreich weit verbreitet und haben neben zahlreichen Darstellungen der offensichtlichen Phänomene zu einer intensiven Erforschung der ihnen zugrundeliegenden Regulationsmechanismen geführt. Während in tierischen Organismen die Regulierung wichtiger Biosynthesen auf der Bildung spezifischer m-RNS beruht (Schrott, 1973), wird ein entsprechender Nachweis bei lichtinduzierten Prozessen in höheren Pflanzen dadurch erschwert, daß durch Belichtung meist mehrere Synthesevorgänge überlagernd induziert werden. Ein bekanntes Beispiel für eine derartige, komplexe Photoregulation stellt die lichtaktivierte Carotinoidbildung in etiolierten Pflanzenkeimlingen dar; sie tritt nur als Teilvorgang einer umfassenderen lichtstimulierten Biosynthese aller Chloroplastenpigmente und der Plastiden selbst auf (Goodwin, 1967; Schnarrenberger und Mohr, 1970). Darüberhinaus zeigt gerade die lichtinduzierte Carotinoidbildung, daß die Photoregulation in verschiedenen biologischen Systemen auch an unterschiedlichen Kontrollpunkten einzugreifen scheint (Lit.-Übers. s. Weeks, 1973); so findet in Chlorella-Mutanten die Differenzierung der Chloroplasten mit der Ausbildung der entsprechenden Pigmente bereits im Dunkeln statt, die Biosynthese cyclischer Carotinoide ist in diesem Organismus hingegen obligat lichtabhängig (Claes, 1967). Eine ähnliche, stimulierende Rolle des Lichtes wurde an löslichen Präparationen von Spinatchloroplasten beobachtet (Kushwaha et al., 1969), während bei gleichartigen Präparationen von Tomatenplastiden keinerlei Einfluß durch Licht nachgewiesen werden konnte (Kushwaha et al., 1970).

Eine obligate Photoregulation der Carotinoidsynthese gibt es aber auch in zahlreichen heterotrophen Mikroorganismen und bestimmten Pilzen, wie *Fusarium*, *Neurospora*, *Cephalosporium diospyri* oder *Verticillium agaricinum* (Lit.-Übers. s. Batra, 1971; Weeks, 1973; Rau, 1975, 1977). Diese Organismen eignen sich zur Aufklärung des Regulationsmechanismus deshalb besonders gut, weil durch das Fehlen des Photosyntheseapparates keine weitere Beeinflussung der speziellen Farbstoffbildung zu erwarten ist. Obwohl ein lückenloser Zusammenhang der nach Photoinduktion ablaufenden Vorgänge auch bei diesen Untersuchungsobjekten noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, lassen sich auf Grund der bisher zur Verfügung stehenden Versuchsergebnisse im Mechanismus der lichtregulierten Carotinoidsynthese drei zeitlich voneinander trennbare Teilschritte unterscheiden: temperaturunabhängige Photoinduktion, vermutliche Neusynthese von carotinoidbildenden Enzymen und Synthese der Farbstoffe selbst. Die beiden letzten Prozesse vermögen auch im Dunkeln abzulaufen, wobei die eigentliche Farbstoffbildung unbedingt sauerstoffabhängig ist.

Die Absorption elektromagnetischer Energie durch bestimmte chemische Substanzen deutet bei einem Vergleich der Absorptionsspektren mit dem Wirkungsspektrum für die Induktion der Carotinoidsynthese bei *Fusarium aquaeductum* (Rau, 1967a, 1975) und *Neurospora crassa* (Zalokar, 1954) auf ein Flavoproteid als Photoreceptor hin, wohingegen bei *Mycobacterium marinum* (Batra und Rilling, 1964) und *Myxococcus xanthus* (Burchard und Hendricks, 1969) ein Porphyrin, bei *Flavobacterium dehydrogenans* (Saleh, 1970) ein Flavin-Porphyrinkomplex vorzuliegen scheint. Allen untersuchten Organismen gemeinsam ist jedoch die Temperaturunabhängigkeit dieses Prozesses (Zalokar, 1955; Rau, 1962; Batra und Rilling, 1964; Seviour und Codner, 1973; Harding, 1974), woraus geschlossen werden kann, daß die Primärreaktion des angeregten Photoreceptors ein photochemischer Prozeß ist. Die Annahme, daß es sich hierbei um eine Photooxidation handeln

könnte, wurde durch mehrere Ergebnisse wahrscheinlich gemacht (Rau, 1975). So wird z.B. in *Fusarium* durch das starke Reduktionsmittel Dithionit die Lichtinduktion vollständig und spezifisch aufgehoben, wenn es kurz nach der Belichtung (5 min) dem Pilzmycel zugesetzt wird; etwa 20 min nach Belichtungsbeginn ist es dagegen bereits völlig unwirksam. Ein durch Belichtung möglicherweise entstehendes "Photooxidationsprodukt" muß also sehr schnell in einer weiteren Reaktion zu einem stabilen Folgeprodukt führen (Theimer und Rau, 1970).

Vorstellungen von der Beschaffenheit des "Photooxidationsproduktes" und seiner potentiellen Funktion bewegen sich noch vollkommen im Bereich der Hypothese, während eine spezifische Proteinbiosynthese nach Lichtinduktion gut belegt ist. Beweise dafür liefern vor allem Ergebnisse, die mit Hilfe von Inhibitoren der Proteinsynthese gewonnen wurden (Rilling, 1964; Harding und Mitchell, 1968; Lit.-Übers. s. Batra, 1971; Weeks, 1973; Rau, 1975). Da die Pigmentsynthese je nach Organismus erst nach einer mehr oder weniger langen lag-Phase beginnt und die Hemmung der Farbstoffbildung durch Proteinsyntheseinhibitoren beträchtlich abnimmt, je später der Hemmstoff nach Belichtungsbeginn zugegeben wird, scheint die lag-Phase ganz offensichtlich den Zeitraum für die Synthese der carotinoidbildenden Enzyme widerzuspiegeln.

Offen ist jedoch nach wie vor die Frage, auf welcher Ebene die "de novo"-Synthese der Enzyme innerhalb der Zellen reguliert wird und welcher Mechanismus der Induktion der Enzyme zugrunde liegt. Viele Befunde über eine Blockierung photo-induzierter Synthesen durch Hemmstoffe der Transkription führten zu der Annahme, daß Licht die Neusynthese von m-RNS bewirkt, und somit eine Enzymregulierung nicht auf der Translationsebene, sondern durch Transkriptionsprozesse stattfindet. Für die durch das Phytochromphotoreceptorsystem gesteuerten Photomorphosen hat Mohr (1966) deshalb die Hypothese der

differentiellen Genaktivierung entwickelt. Da es aber gerade für Phytochrom-regulierte Vorgänge Ergebnisse gibt, die sich nicht mit dem Konzept der differentiellen Genaktivierung vereinbaren lassen (Lit.-Übers. s.Schopfer, 1973), war ein erstes Ziel dieser Arbeit, auch andere Möglichkeiten der Photoregulation bei der lichtinduzierten Carotinoidsynthese in *Fusarium aquaeductum* zu überprüfen.

Schnelle, über Phytochrom gesteuerte Reaktionen, wie sie etwa bei Blattbewegungen (Fondeville et al., 1966) oder bei der Änderung der Syntheserate von Anthocyanen in *Sinapis alba* (Lange et al., 1967) auftreten, lassen eine Photoregulation der Enzym-Aktivität weit plausibler erscheinen als eine Steuerung der Enzym-Synthese. Für den zugrundeliegenden Mechanismus wird vielfach diskutiert, daß Licht in erster Linie eine Änderung von Membraneigenschaften bewirkt, als deren Folge dann biochemische Umwandlungen eintreten (Lit.-Übers. s.Briggs and Rice, 1972). Es liegt nun nahe anzunehmen, daß ein derartiger Lichteinfluß vielleicht durch permeabilitätsändernde Substanzen simuliert werden könnte. Diese Vorstellung wird dadurch bestärkt, daß in einigen pflanzlichen Geweben der Nachweis des bei der Nervenleitung beteiligten Acetylcholins gelang (Jaffe, 1970; Hartmann, 1971). Jaffe konnte darüberhinaus zeigen, daß in Mung-Bohnen die Bildung von Acetylcholin durch Phytochrom reguliert wird und daß diese permeabilitätsändernde Substanz Rotlicht bei einigen Wirkungen ersetzen kann. Auch bei weiteren Photomorphosen, bei denen Phytochrom als Photoreceptor angenommen wird, konnten mit Acetylcholin ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Briggs and Rice, 1972; Kandeler, 1972). Zudem gelang es Bieth et al. (1970) zu zeigen, daß die Aktivität der Acetylcholinesterase in vitro durch photochrome Agentien kontrolliert werden kann; diese Autoren vermuteten daher eine Beteiligung ähnlicher Systeme auch an photomorphogenetischen Prozessen.

Obwohl Pilze einen vom Phytochromsystem höherer Pflanzen verschiedenen Photoreceptor besitzen (Batra, 1971; Rau, 1975), konnten Gressel et al. (1971) beim Pilz *Trichoderma viride* die normalerweise blaulichtinduzierte Sporenbildung allein durch Zugabe von Acetylcholin in Verbindung mit dem Cholinesterasehemmstoff Eserin hervorrufen. Mit Hilfe dieser Substanzen haben wir daher versucht, Anhaltspunkte für eine mögliche Membranpermeabilitätsänderung als auslösenden Faktor im Induktionsmechanismus der Carotinoidsynthese in *Fusarium aquaeductuum* zu finden.

Nachdem die entsprechenden Versuche eindeutig negative Ergebnisse erbracht hatten, sollte die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit darin bestehen, die Beteiligung von Transkriptionsprozessen an der Photoregulation der Carotinoidsynthese zu untersuchen und somit das Konzept einer differentiellen Genaktivierung für diesen Fall zu überprüfen. Es gibt nämlich bis jetzt nur einige wenige Ergebnisse, die auch für die lichtabhängige Carotinoid-synthese in Bakterien und Pilzen eine entsprechende Annahme unterstützen: In *Mycobacterium* sp. wird die photoinduzierte Carotinoidbildung durch den RNS-Synthesehemmstoff Proflavin unterbunden, die Spezifität dieses Effektes wurde aber nicht weiter kontrolliert (Batra and Storms, 1968). Auch in *Fusarium aquaeductuum* bewirkte Proflavin eine vollständige Hemmung der Carotinoidsynthese; intensivere Untersuchungen verdeutlichten allerdings, daß der Hemmstoff nicht die Transkription, sondern den Photoreceptor selbst beeinflußt (Schrott, 1973). Actinomycin D, ebenfalls als Hemmstoff der Transkription bekannt, beeinträchtigt die Carotinoid-synthese in *Verticillium agaricinum* (Mummery and Valadon, 1973) und in *Neurospora crassa* (Subden and Bobowski, 1973) nur wenig, während es in *Flavobacterium dehydrogenans* bei Zugabe vor Belichtung die Farbstoffbildung zwar vollständig blockiert,

ohne jedoch einen entsprechend starken Effekt auf den Nucleosidstoffwechsel zu zeigen (Weeks, 1973); bei *Fusarium* erwies sich Actinomycin dagegen als unwirksam (Rau, unveröff.). Neben diesen Resultaten, die indirekt auf eine Beteiligung des Nucleinsäuresystems an den Prozessen der Lichtinduktion hinweisen, wurde allerdings auch eine direkte Wirkung der Photoinduktion auf die Rate der RNS-Synthese in *Verticillium agaricinum* nachgewiesen (Valadon, 1974; Valadon et al., 1975).

Eine Regulation auf der Ebene der Transkription sollte eine Neusynthese von spezifischer m-RNS beinhalten. Mit den Methoden der MAK-Chromatographie, Saccharose-Dichtegradienten-Analyse und Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist es aber weder Dittes und Mohr (1970) bei der phytochromgesteuerten Morphogenese in *Sinapis alba*, noch Harel and Bogorad (1973) bei der Lichtwirkung auf ergrünende Blätter von *Zea mays* gelungen, die Bildung einer spezifischen m-RNS als Folge der Photoinduktion direkt nachzuweisen; ebenso blieben ähnliche Untersuchungen bei der lichtinduzierten Carotinoidsynthese in *Fusarium aquaeductuum* zunächst ohne Erfolg (Schrott, 1973). Mit Hilfe der Affinitätschromatographie konnten Schrott und Rau (1977) allerdings kürzlich das Auftreten einer lichtinduzierten poly A-haltigen RNS-Fraktion in *Fusarium* belegen. Eine Spezifizierung dieser neugebildeten RNS und der Nachweis ihrer Fähigkeit, als Matrize für eine in vitro-Proteinsynthese zu dienen, stehen jedoch noch aus. Um das Problem nun von einer anderen Seite angehen zu können, wurde weiter nach Hemmstoffen der RNS-Synthese gesucht, die in der Lage sind, die Carotinoidsynthese selektiv zu blockieren. Mit Hilfe solcher Substanzen sollte dann, ähnlich wie mit Proteinsyntheseinhibitoren bei der Translation (Bindl et al., 1970), indirekt der Nachweis einer de novo-Synthese von spezifischer m-RNS geführt werden. Zudem könnte die zeitliche Abgrenzung der ablaufenden Teilprozesse vervollständigt werden, wenn die angenommene Neusynthese von Nucleinsäuren in der relativ kurzen Zeit zwischen Photoinduktion und Enzymsynthese nachgewiesen wird.

Über die bisher dargelegte Fragestellung hinaus könnten vielleicht zusätzliche Anhaltspunkte für den Mechanismus der Lichtinduktion der carotinoidbildenden Enzyme gefunden werden. Bei Versuchen mit Hilfe des Proteinsynthesehemmstoffes Cycloheximid hatten nämlich Bindl et al. (1970) nachgewiesen, daß eine Zugabe des Inhibitors zu verschiedenen Zeiten nach Belichtungsbeginn zu einer differentiellen Blockierung der Synthese der einzelnen Carotinoide führt. Sie hatten daraus auf eine sequentielle Synthese der carotinoidbildenden Enzyme geschlossen und für den entsprechenden Induktionsmechanismus zwei Möglichkeiten diskutiert: (1) Nur das erste Enzym des Biosyntheseweges ist photoreguliert, während die folgenden Biokatalysatoren durch ihr Substrat induziert werden, oder (2) das Licht löst eine gleichzeitige Induktion aller notwendigen Enzyme aus. Einschlägige Untersuchungen (Lang und Rau, 1972) sprechen nun überzeugend für die letztgenannte Interpretation. Bislang konnte jedoch keine Entscheidung darüber getroffen werden, ob das sequentielle Erscheinen der carotinoidbildenden Enzyme auf einer sequentiellen Translation der zugrundeliegenden Information beruht, oder ob diese Information bereits selbst sequentiell transkribiert wird. Da aber in *Fusarium aquaeductum* die Enzyme des Carotinoidbiosyntheseweges noch nicht isoliert und identifiziert sind, kann ein Hinweis auf eine möglicherweise sequentielle Transkription der notwendigen Information ebenfalls nur indirekt über die Anwendung spezifisch wirksamer RNS-Synthesehemmstoffe erbracht werden.

Material und allgemeine Methodik

1. Anzucht von *Fusarium aquaeductum*

Wie bereits in früheren Untersuchungen (Rau, 1967b, 1976) wurden auch in der vorliegenden Arbeit die Versuche mit dem imperfekten Wasserpilz *Fusarium aquaeductum* (Lagerh.) durchgeführt. Der Pilz wurde in Erlenmeyerkolben in völliger Dunkelheit angezogen. Als Nährmedium diente vorwiegend eine 3 %ige Biomalzlösung, für einige Versuche jedoch auch eine halbsynthetische Nährflüssigkeit bestehend aus 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl_2 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 g KH_2PO_4 , 2 g NH_4NO_3 , 5 g Ammoniumtartrat, 20 g Glukose, 5 g Hefeextrakt pro Liter dest. Wasser; pH 5,6 (Laborbezeichnung FYG; Feulner, Diss. 1969). 300 ml steriles Kulturmedium wurden mit 10 ml Pilzsuspension (entsprechend 25-30 mg Trockengewicht) beimpft und in einer Dunkelkammer bei konstanter Temperatur ($22^\circ\text{C} \pm 1$) auf einer Schüttelmaschine belassen.

Nach etwa 40-stündigem Wachstum wurde das Pilzmycel mittels eines Büchner-Trichters vom Nährboden abfiltriert, mehrmals mit dest. Wasser gewaschen und in dest. Wasser resuspendiert. Durch kräftiges Schütteln wurde eine weitgehend homogene Suspension erreicht (im folgenden als "Stammuspension" bezeichnet). Ein Aliquot davon wurde zur Trockengewichtsbestimmung und zur Bestimmung des Carotinoidgehaltes zu Versuchsbeginn, des sog. Startwertes, verwendet.

Sämtliche Arbeitsvorgänge wurden bei einem für die Lichtinduktion unwirksamen, schwachen Rotlicht (Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W, Lichtfarbe 15, davor rote Plexiglasscheibe Röhm und Haas, Darmstadt, Nr. 501) ausgeführt.

2. Versuchsdurchführung

Von der "Stammssuspension" des Pilzes wurden jeweils 50 ml in 250 ml-Gaswaschflaschen pipettiert, in denen bereits 50 ml einer Puffer-Glukose-Lösung ($1/30$ M KH_2PO_4 + 0,1 M Glukose; im folgenden als PG-Lösung bezeichnet !) vorlagen.

Mittels eines ständigen Gasdurchstroms (Sauerstoff bzw. Luft) hielten wir das Mycel unter maximal aeroben Bedingungen; zusätzlich wurde dadurch in entsprechenden Proben eine gleichmäßige Belichtung aller Hyphen erreicht.

Zur Belichtung wurden die Gaswaschflaschen zwischen zwei Aggregaten aus je drei horizontal übereinander angeordneten Leuchtstoffröhren (Osram, 65 W, Lichtfarbe 15, mit Reflektor) mit einer Lichtintensität von je 16 000 Lux aufgestellt. Die Pigmentsynthese selbst kam während einer 24-stündigen Nachreaktionszeit im Dunkeln unter ständiger Belüftung zum Abschluß.

3. Extraktion und Messung der Carotinoide ("Gesamtfarbstoff")

Zur Extraktion der gebildeten Pigmente wurde das Pilzmycel jeder Probe aus der Versuchslösung abfiltriert, mit dest. Wasser gewaschen und mit etwa 25 ml Methanol (100 %) quantitativ in ein Plastikfläschchen (100 ml) mit 25 g Glasperlen ($\varnothing$ 4,8 mm) gespült. Das Mycel wurde mindestens 30 min lang auf einer Schüttelmaschine geschüttelt und dadurch weitgehend zerschlagen. Zugabe von 25 ml Aceton und nochmaliges 1/2-stündiges Schütteln lösten die Carotinoide vollständig aus dem Mycel. Der Farbstoffextrakt wurde dann abgenutscht und der Mycelrest mit Aceton nachgespült.

Die Carotinoide wurden im Scheidetrichter mit Hilfe von 10 %iger Ammoniumsulfatlösung aus dem Methanol-Aceton-Gemisch in Petroläther (Kp 30-50°) übergetrieben. Nach mehrmaligem

Waschen mit dest. Wasser wurde die Petrolätherphase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und in einem Büchi-Vakuumrotationsverdampfer bei etwa 22°C bis zur Trockene eingedampft. Der Farbstoff wurde dann sofort in einer genau bestimmten Menge Petroläther wieder aufgenommen und seine Absorption im Bereich von 450-485 nm in einem Spektralphotometer (Beckmann Modell B bzw. Zeiss PMQ II) gemessen. Als Maß für die Farbstoffmenge diente die Extinktion im Absorptionsmaximum.

Da der auf diese Weise erhaltene Farbstoff ein Gemisch aus verschiedenen Carotinoiden darstellt, wird er im folgenden als "Gesamtfarbstoff" bzw. Gesamtextrakt bezeichnet.

4. Darstellung

Die in den Abbildungen und Tabellen angeführten Werte sind Mittelwerte aus 3 bis 6 Versuchen, meist mit 2 Parallelproben.

Versuche zur Beteiligung von Acetylcholin bei der Licht-induktion der Carotinoidsynthese.

1. Versuchsdurchführung

Submerskultur

Um die Carotinoidsynthesefähigkeit des Mycels voraussetzen zu können, wurden Parallelproben in PG-Lösung 30 min lang belichtet. Die übrigen Proben wurden ständig im Dunkeln gehalten und abgesehen von Kontrollen mit verschiedenen Konzentrationen steriler Acetylcholin- bzw. Eserinlösung versetzt.

Zur Herstellung anaerober Bedingungen wurde mit nachgereinigtem Stickstoff begast, wobei zwei Waschflaschen mit basischer Pyrogallollösung und eine Waschflasche mit dest. Wasser vorgeschaltet wurden.

Oberflächenkultur

Sterilisierte Petrischalen mit einem Nährmedium aus FYG und Agar bzw. aus Corn-Meal-Agar wurden mit je 1 ml Pilzsuspension in FYG beimpft. Nach drei Tagen im Dunkeln bei 30°C waren die Nährböden mit einem fast lückenlosen Pilzrasen überzogen.

Die Platten wurden dann mit verschiedenen Konzentrationen steriler Acetylcholin- und Eserinlösungen versetzt und zur Nachreaktion weitere 4 Tage im Dunkeln bei Zimmertemperatur belassen.

Als Kontrolle dienten belichtete und unbelichtete Platten ohne Acetylcholin und Eserin.

2. Ergebnisse

Zur Prüfung, ob Acetylcholin bei der durch Blaulicht induzierten Carotinoidsynthese das Licht ersetzen kann, wurde zunächst die Wirkung dieses Stoffes in Submerskultur getestet. Da sich bei einmaliger Zugabe kein Ersatz der Lichtinduktion zeigte, wurde die permeabilitätsändernde Substanz dreimal in Abständen von jeweils 30 min dem Kulturmedium zugefügt; dadurch sollte eine eventuelle Hydrolisierung im wäßrigen Medium ausgeglichen werden. Es konnte jedoch auch nach einer Nachreaktionszeit von 24, 36 oder 72 Stunden nicht die geringste Erhöhung des Farbstoffgehaltes über den Dunkelwert gemessen werden.

Ebensowenig zeigte sich eine Pigmentneusynthese bei Versuchen mit Oberflächenkulturen, obschon hier das wäßrige Medium auf ein Minimum reduziert war und durch mehrmalige Zugabe von Acetylcholin eine mögliche Zerstörung dieser Substanz ebenfalls ausgeglichen werden sollte.

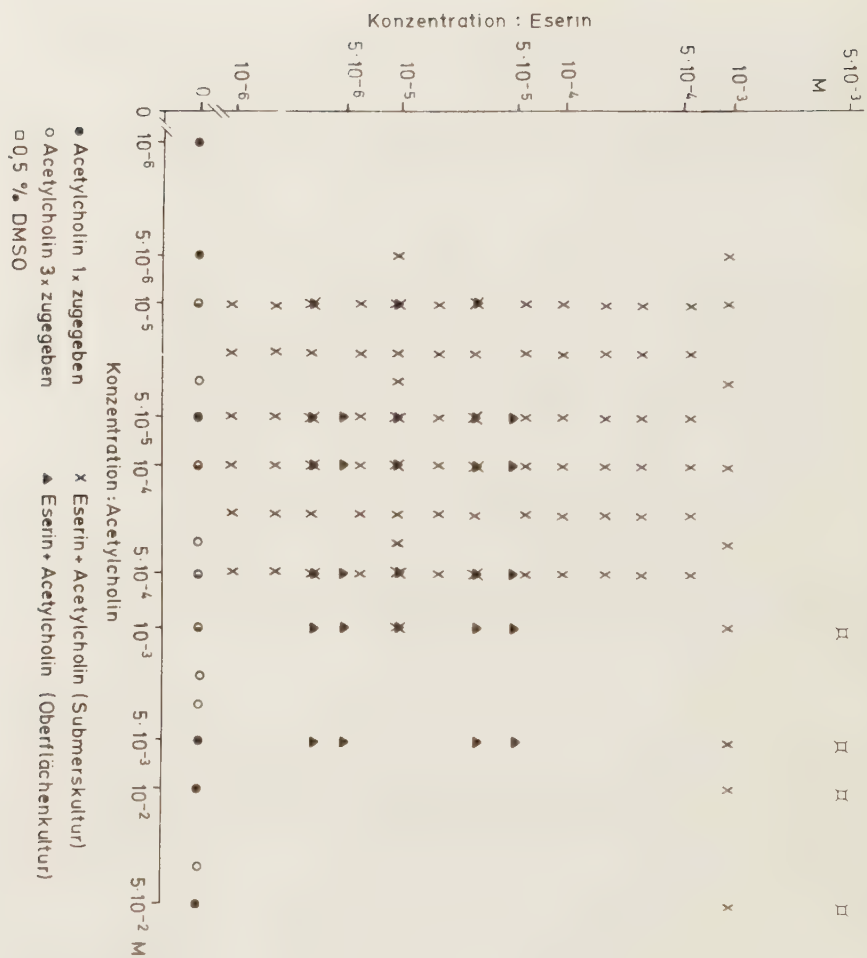
Allerdings mußte auch noch ein enzymatischer Abbau des Acetylcholins in Betracht gezogen werden, wie er von tierischen Geweben her bekannt ist. Die Cholinesterasen sind zwar äußerst aktiv, sie können jedoch durch eine Reihe von Pharmaka in ihrer Tätigkeit spezifisch gehemmt werden (Florey, 1970). Zu diesen "Anticholinesterasen" zählen z.B. E 605, Prostigmin und Eserin. So konnten auch Gressel et al. (1971) beim imperfekten Pilz *Trichoderma* eine Induktion der Sporenbildung durch Acetylcholin nur in Anwesenheit von Eserin erzielen. Aus diesem Grunde überprüften wir nun, ob möglicherweise durch eine gleichzeitige Eserinapplikation eine Induktion der Farbstoffsynthese mittels Acetylcholin ausgelöst werden kann.

Eserin wurde entweder 120 oder 30 min vor, bzw. gleichzeitig mit Acetylcholin in verschiedenen Kombinationen appliziert. Um ein Eindringen dieser Substanzen in die Zellen eventuell zu erleichtern, wurde in einigen Fällen mit dem permeabilitätsfördernden Dimethylsulfoxid (DMSO) vorinkubiert. Einen Über-

blick über die angewendeten Konzentrationen und Kombinationen gibt Tabelle 1. Obwohl das Pilzmycel durch keine der angewendeten Chemikalien merklich geschädigt wurde, zeigte Acetylcholin in keinem Fall den geringsten photomimetischen Effekt auf die Farbstoffbildung in *Fusarium aquaeductum*.

Um eine mögliche oxidative Zerstörung des Acetylcholins durch den Luftsauerstoff in Submerskulturen zu verhindern, wurde außerdem versucht, eine Pigmentinduktion unter anaeroben Bedingungen zu erreichen. Eine 15-minütige Vorbelüftung mit Stickstoff gewährleistete eine hinreichend sauerstofffreie Atmosphäre. Diese Anaerobiosis wurde während einer dreimaligen Acetylcholinapplikation noch weitere 2 Stunden aufrechterhalten. Da in *Fusarium* die Pigmentsynthese selbst jedoch nur in Gegenwart von Sauerstoff abläuft (Rau, 1969), wurde noch weitere 40 Stunden mit Luftsauerstoff nachbelüftet. Auch unter diesen Versuchsbedingungen konnte nicht die geringste Erhöhung der Farbstoffbildung über den Dunkelwert erzielt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gressel et al. (1971) kann somit ein Ersatz der Blaulichtinduktion durch Acetylcholin für die Carotinoidsynthese in *Fusarium aquaeductum* ausgeschlossen werden.



Tab. 1:
Überblick über die
für einen möglichen
Ersatz der Lichtin-
duktion angewendeten
Konzentrationen und
Kombinationen von
Acetylcholin, Eserin
und DMSO.

Versuche zum Nachweis einer Beteiligung der Transkription am Mechanismus der Lichtinduktion der Carotinoidsynthese.

I. Die Wirkung von Hemmstoffen und Antimetaboliten der Transkription auf die Carotinoidsynthese

1. Wirksamkeit verschiedener Hemmstoffe und Antimetabolite

Nachdem bereits in früheren Untersuchungen (Schrott, Diss.1973) festgestellt worden war, daß verschiedene Transkriptionshemmstoffe (z.B. Proflavin, Actinomycin D, α -Amanitin, Rifampicin) die lichtinduzierte Carotinoidsynthese bei *Fusarium aquaeductuum* nicht vollständig bzw. nicht spezifisch hemmen, wurde nun die Wirkung weiterer, aus der Literatur als Hemmstoffe bzw. Antimetabolite der Transkription bekannter Substanzen geprüft.

Dazu wurden von der "Stammssuspension" des Pilzes (siehe Material und allgemeine Methodik) je 50 ml in 250 ml-Gaswaschflaschen gefüllt, in denen bereits 50 ml einer PG-Lösung vorlagen. Die zu prüfenden Substanzen wurden der Pilzsuspension im Dunkeln zugegeben; nach 15-30 min wurde 10 min lang belichtet und dann das Mycel bis zum Abschluß der Farbstoffsynthese weitere 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die Wirkung der Hemmstoffe wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 μ M bis 1 mM untersucht; als Kontrollen dienten belichtete und ständig im Dunkeln gehaltene Proben ohne Hemmstoff. Als Maß für die Carotinoidbildung bzw. deren Hemmung wurde die Differenz der am Ende des Versuchs (24 h) extrahierbaren Mengen an "Gesamtfarbstoff" (siehe Material und allgemeine Methodik) zwischen den belichteten Proben und den Dunkelkontrollen angenommen.

Die in Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse zeigen die verschiedenen Wirkungen der geprüften Substanzen in Abhängigkeit von der Konzentration auf die lichtinduzierte Pigmentbildung.

Synthesehemstoffe	wirksame Konzen- tration (μ M)	Farbstoffmenge in % der Kon- trolle ohne Hemmstoff
Bacitracin	--	100
Acriflavin	--	100
Canavanin	--	100
Aureomycin	100	118
	300	146
Tetracyclinbase	100	157
Nalidixinsäure	1000	121
	10	140
Myxin	30-300	0
	10	140
Lomofungin	20-80	0
	4	152
Chromomycin A3	100	33
Distamycin	300	0
Basenanaloge		
6-Methyl-Purin	1000	81
Tubercidin	300	0

Tab.2: Die Wirkung verschiedener Hemstoffe und Antimetabolite auf die lichtinduzierte Carotinoidsynthese von *Fusarium aquaeductum*.

Während die Antibiotika Bacitracin, Acriflavin und Canavanin keinerlei Einfluß auf die Farbstoffsynthese zeigten, steigerten die Tetracycline (Aureomycin und Tetracyclinbase) in den angegebenen Konzentrationen die lichtinduzierte Pigmentbildung erheblich. Die gleiche Wirkung hatte das antibakterielle Agens Nalidixinsäure; es beeinflusst in *Escherichia coli* hauptsächlich die DNS-Replikation und wirkt sich auf die RNS-Synthese erst dann hemmend aus, wenn auch die Proteinsynthese unterbunden ist (Javor, 1974). Die für die Förderung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese verantwortliche Reaktion ist in allen Fällen jedoch noch völlig ungeklärt.

Sowohl eine Steigerung als auch eine Hemmung der Pigmentbildung zeigte sich konzentrationsabhängig bei den gefärbten Substanzen Myxin und Lomofungin. Während über den Wirkungsmechanismus von Myxin noch wenig bekannt ist, ist Lomofungin als Inhibitor der RNS-Synthese in Hefen gut untersucht (Lit.-Übers. Ruet et al., 1975). Eine fördernde Wirkung dieser Hemmstoffe bei geringen Konzentrationen ist ebenfalls erstaunlich und scheint zunächst unverständlich. Nachdem es sich hier aber um gefärbte Stoffe handelt, wäre die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß sie ähnlich wie z.B. Methylenblau (Lang-Feulner und Rau, 1975) als zusätzliche Photorezeptoren dienen; Lang-Feulner und Rau fanden nämlich, daß die lichtinduzierte Carotinoidsynthese durch eine Vorinkubation mit diesem photodynamischen Farbstoff in *Fusarium aquaeductuum* auf das Doppelte gesteigert wurde. Als möglicher Mechanismus wird die Übertragung der Anregungsenergie von Methylenblau auf das natürliche Photorezeptorsystem im Pilzmycel diskutiert. Die totale Hemmung der Carotinoidbildung bei höheren Myxin- bzw. Lomofunginkonzentrationen erwies sich als weitgehend unspezifisch und dürfte vornehmlich durch eine rasch einsetzende allgemeine Schädigung des Mycels ausgelöst worden sein; Messungen im Warburg-Apparat zeigten nämlich eine deutlich zunehmende Beeinträchtigung der Atmungsrate während der Inkubationszeit.

Nur mit Chromomycin A3 und Distamycin A-Hydrochlorid konnte eine ausschließlich hemmende Wirkung auf die Pigmentbildung erzielt werden. Da jedoch Chromomycin A3 auch in der höchsten, für das Pilzmycel gerade noch zuträglichen Konzentration (100 μ M) noch eine Farbstoffproduktion von 33 % der belichteten Kontrolle ohne Inhibitor zuließ, erschien dieser Hemmstoff für eine weitere Anwendung ebenfalls ungünstig. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, stellte sich schließlich von den Synthesehemmstoffen nur Distamycin A-Hydrochlorid für die geplanten Untersuchungen als hinreichend geeignet heraus: Eine rasche und vollständige Hemmung der Pigmentsynthese kommt durch Interaktion mit den Prozessen der Photoinduktion zustande und nicht durch unspezifische Schädigung des Mycels.

Den Basenanaloga kommt innerhalb der Transkriptionshemmstoffe insofern eine besondere Bedeutung zu, als sie die Neusynthese einer m-RNS nicht verhindern, sondern durch Einbau in die Nucleinsäuren die Matrizen derart verändern, daß diese nicht mehr oder falsch "abgelesen" werden. Als Vertreter solcher Antimetabolite haben wir die Adeninanaloga 6-Methyl-Purin und Tubercidin in die Untersuchungen einbezogen.

In der Konzentration von 1 mM hemmt 6-Methyl-Purin sofort die gesamte RNS-Synthese in *Chlorella pyrenoidosa* (Lit.-Übers.: McCullough and John, 1972), während die Proteinsynthese erst im Laufe einer mehrstündigen Inkubationszeit beeinträchtigt wird. Der hemmende Einfluß wird auf den Ersatz von Adenin durch das Analogon im RNS-Stoffwechsel zurückgeführt (siehe auch Chen, 1968).

In *Fusarium* wurden allerdings selbst bei Endkonzentrationen von 1-10 mM noch 81 bzw. 73 % der im Licht ohne 6-Methyl-Purin gebildeten Carotinoidmenge synthetisiert.

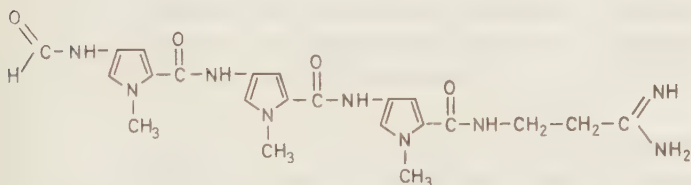
Das zweite Adenosinanalogen, Tubercidin, zeigte hingegen ähnlich wie Distamycin die für unsere Untersuchungen erforderlichen

Eigenschaften: schnelle und totale Hemmung der Farbstoffsynthese innerhalb eines engen Konzentrationsbereiches ohne wesentliche Beeinträchtigung des übrigen Zellstoffwechsels; letzteres konnte wiederum durch Messungen der Sauerstoffaufnahme im Warburg-Apparat während des Versuchsablaufes bestätigt werden.

Da wir nun in Distamycin und Tubercidin zwei in der Literatur (Puschendorf et al., 1974; Acs and Reich, 1967) allgemein als Transkriptionshemmstoffe anerkannte Substanzen gefunden hatten, die die lichtinduzierte Carotinoidsynthese unterbinden können, war das nächste Ziel der Arbeit, ihre spezifische Wirkung näher zu untersuchen.

2. Die Wirkung von Distamycin

Bei dem Antibiotikum Distamycin A aus *Streptomyces netropsis* handelt es sich um ein basisches Oligopeptid aus 3 säureamidartig verbundenen Methylpyrrolkernen und einer basischen Propionamidin-Seitenkette:



Distamycin A

Es konnte nachgewiesen werden, daß das Antibiotikum die DNS-abhängige DNS- und RNS-Synthese im zellfreien System hemmt (Puschendorf und Grunicke, 1969; Chandra et al., 1970; Zimmer et al., 1971). Diese Wirkung beruht auf einer Interaktion mit

der DNS und nicht mit der Polymerase; die Struktur des Distamycin/DNS-Komplexes ist zur Zeit noch nicht genau bekannt. Nach Untersuchungen von Zimmer and Luck (1970), Krey and Hahn (1970), sowie Zimmer and Reinert (1971) kommt es zu einer salzartigen Bindung über die Propionamidin-Seitenkette und zu einer Interaktion der Methylpyrrolringe mit den Basen der DNS; hierdurch wird eine Konformationsänderung der DNS ausgelöst. Da bei der Bindung eine Bevorzugung A-T-reicher Bezirke der DNS auftritt, kann geschlossen werden, daß die Distamycin/DNS-Interaktion nicht völlig wahllos erfolgt.

Puschendorf et al. (1974) konnten zeigen, daß auch in einem DNS-abhängigen RNS-Polymerase-System, bestehend aus T4-DNS und Polymerase aus E.coli, die Hemmung der RNS-Synthese durch Distamycin nicht in jedem beliebigen Abschnitt der Reaktion erfolgt; bis zu einem Verhältnis von 1 Mol Distamycin zu 30 Nucleotide DNS findet selektiv eine Hemmung der Initiation, aber nicht der Elongation statt. Wenn also nur eine Hemmung der Initiation auftritt, sollte Distamycin, das nach dem Start der RNS-Synthese zugesetzt wird, zunächst keine Blockierung hervorrufen, solange bis zur Aufrechterhaltung der RNS-Synthese neue Kettenstarts notwendig werden. Dies wurde auch von Puschendorf et al. nachgewiesen.

2.1. Konzentrationsabhängigkeit

Das Pilzmycel wurde in Gaswaschflaschen 12 min im Dunkeln mit verschiedenen Distamycinkonzentrationen vorinkubiert und nach einer 10-minütigen Belichtung 24 Stunden im Dunkeln belassen; nach dieser Zeit wurde der Farbstoff extrahiert und die jeweils vorhandene Menge in % der unbehandelten, belichteten Kontrolle berechnet. Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, wird die durch

Licht hervorgerufene Farbstoffbildung mit steigender Distamycinkonzentration zunehmend gehemmt.

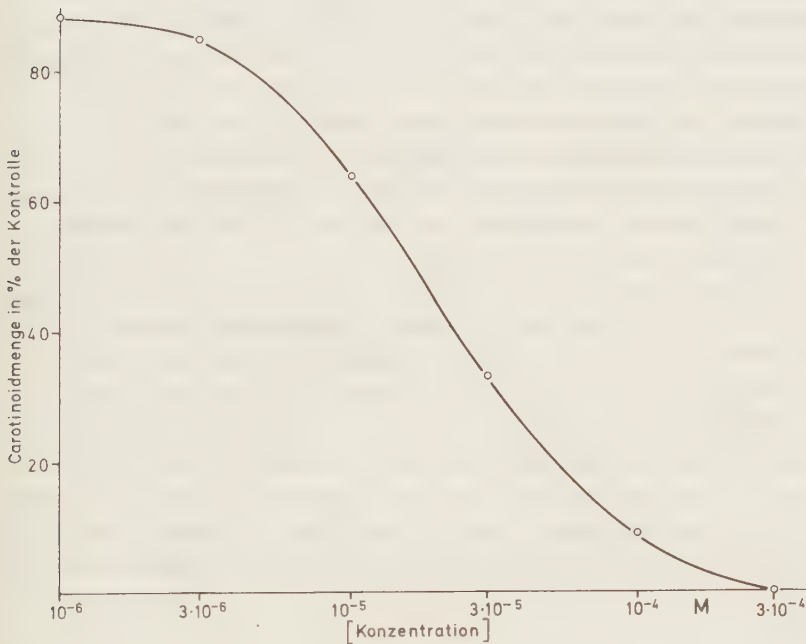


Abb. 1: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der licht-induzierten Carotinoidsynthese durch Distamycin.

Die für eine vollständige Unterdrückung der Pigmentproduktion ausreichende Konzentration von 3×10^{-4} M wurde bei allen weiteren Versuchen verwendet; daß bei dieser Konzentration das Pilzmycel während der ersten Inkubationsstunden nicht und später auch nur in geringem Ausmaß beeinträchtigt wird, konnte durch Messung der Sauerstoffaufnahme über die Hyphen im Warburg-Apparat festgestellt werden.

2.2. Zeitabhängigkeit der Wirkung in Beziehung zur Photoinduktion

Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, müßte eine vermutete Synthese von m-RNS in der Sequenz der durch das Licht ausgelösten Schritte zwischen der "Primärreaktion" (Photooxidation) und der Neusynthese der carotinoidbildenden Enzyme liegen. Für eine zeitliche Einordnung und um ein Kriterium für die Spezifität der Distamycin-Wirkung zu erhalten, sollte weiterhin geprüft werden, in welchem Zeitabschnitt nach der Photoinduktion der Inhibitor die Carotinoidsynthese hemmt.

Dazu wurde Distamycin (3×10^{-4} M) zu verschiedenen Zeiten vor und nach einer 10 min dauernden Belichtung der Pilzsuspension zugesetzt und nach ca. 24 Stunden die synthetisierte Farbstoffmenge bestimmt.

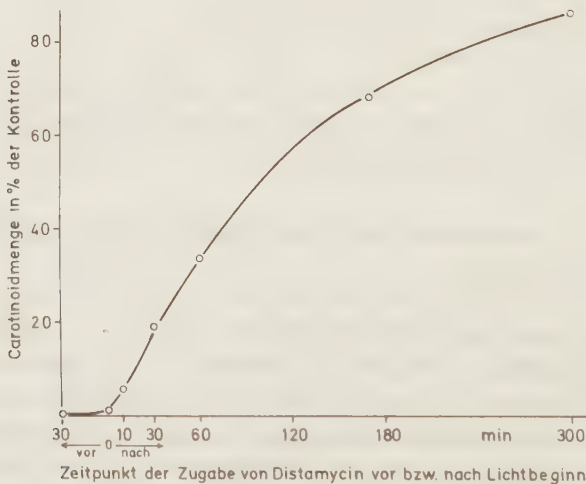
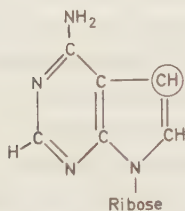


Abb.2: Hemmung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese durch Distamycin (3×10^{-4} M), das verschiedene Zeiten vor oder nach Belichtung zugegeben wurde; die Bestimmung der Farbstoffmenge erfolgte 24 h nach Lichtbeginn.

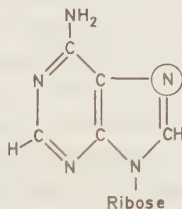
Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeit der Hemmung vom Zeitpunkt der Inhibitorzugabe. Bereits bei Zugabe zu Beginn, deutlicher aber 10 min nach Beginn der Belichtung, ist Distamycin nicht mehr in der Lage, die Carotinoidsynthese vollständig zu unterdrücken. Obwohl nach früheren Untersuchungen (Bindl et al., 1970) mit Hilfe des Proteinsynthesehemmstoffes Cycloheximid die lichtinduzierte Synthese der carotinoidbildenden Enzyme nach ca. 5 Stunden beendet ist, wird bei einer Zugabe von Distamycin nach 5 Stunden noch nicht der Wert der Kontrolle ohne Hemmstoff erreicht. Dies deutet daraufhin, daß eine Hemmung der gesamten RNS-Synthese während der Nachinkubationszeit zu einer gewissen Beeinträchtigung der Pigmentsynthese selbst führt, die zu diesem Zeitpunkt noch in vollem Gange ist.

3. Die Wirkung von Tubercidin

Das Adenosinanalogon Tubercidin (Lit.-Übers. Acs and Reich, 1967) wird von *Streptomyces tubercidicus* produziert und entsteht möglicherweise durch Ersatz des Glycins in der Purinsynthese durch eine C-3-Säure (z.B. Glycerinsäure oder Brenztraubensäure):



Tubercidin



Adenosin

Tubercidin hemmt das Wachstum verschiedener Mikroorganismen, u.a. von *Mycobacterium tuberculosis*. Da es als Substrat für Adenosinkinase dient, sind Organismen mit wenig oder keiner Adenosinkinase gegen Tubercidin weitgehend resistent. Der Eintritt in den Stoffwechsel erfolgt wahrscheinlich durch Konvertierung in das entsprechende Nucleosidmonophosphat; die Phosphorylierung wird an der 5'-Position durch Adenosinkinase angenommen.

Bei wachsenden Mäusefibroblasten konnte der Einbau von radioaktiv markiertem Tubercidin in RNS und DNS nachgewiesen werden. Dadurch wird sowohl die DNS- und RNS- als auch die Proteinsynthese beeinträchtigt (Acs and Reich, 1967). Bei Säugetieren blockiert Actinomycin die Inkorporierung von Tubercidin in RNS, nicht jedoch seine Aufnahme und Phosphorylierung oder den Einbau in die DNS.

Wird Tubercidin in die Endgruppen der t-RNS anstelle von Adenosin eingebaut, so funktioniert die resultierende t-RNS im Hinblick auf die Aminoacylierung durch aktivierende Enzyme, Assozierung mit ribosomensynthetisierten Polynucleotid-komplexen und Übertragung von Aminosäuren in Polypeptide wie in einem unbehandelten Organismus.

3.1. Konzentrationsabhängigkeit

Nachdem sich auch Tubercidin als geeigneter Hemmstoff der lichtinduzierten Carotinoidsynthese bei *Fusarium aquaeductum* erwiesen hatte, mußte zunächst - ebenso wie bei Distamycin - die geringste, noch vollständig hemmende Konzentration bestimmt werden. Dazu wurde Tubercidin in entsprechenden Konzentrationen dem Pilzmycel 15-30 min vor Beginn der Belichtung appliziert, 10 min lang belichtet und nach 24 Stunden der Pigmentgehalt bestimmt. Die Ergebnisse (Abb.3) zeigen eine relativ steile Zunahme der Hemmwirkung im Bereich von 3×10^{-6} bis 3×10^{-5} M.

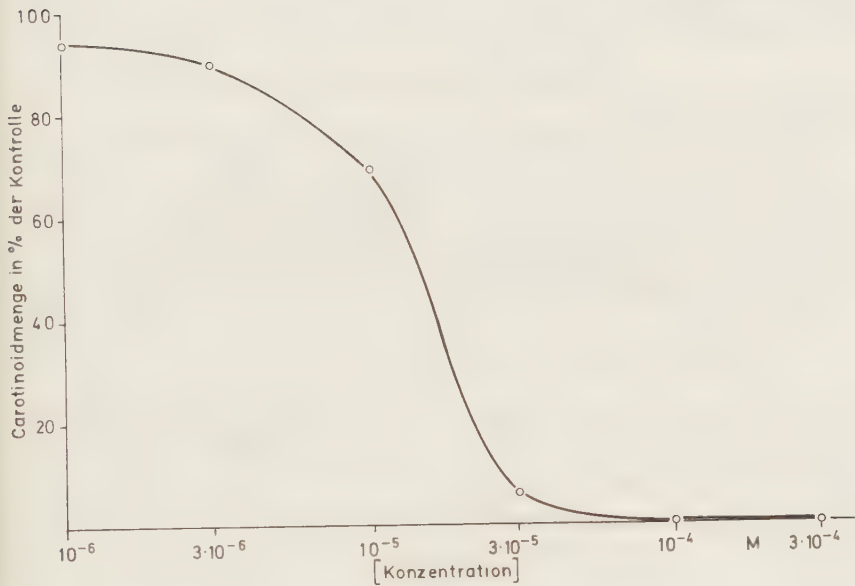


Abb. 3: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der licht-induzierten Carotinoidsynthese durch Tubercidin.

Die für eine vollständige Unterdrückung der Carotinoid-synthese ausreichende Konzentration von 10^{-4} M wurde bei fast allen weiteren Versuchen angewendet. Anhand der Sauerstoffaufnahme des Mycels (gemessen im Warburg-Apparat) ergab sich allerdings, daß diese Konzentration den Stoffwechsel des Pilzes nach 4 Stunden doch erheblich stärker beeinträchtigt als Distamycin; ab diesem Zeitpunkt verbrauchte das Mycel nur noch ca. 65 % der Sauerstoffmenge von ungehemmten Kontrollen. Als Ursache dafür könnte möglicherweise ein Ersatz des Adenosins durch Tubercidin bei einigen Stoffwechselvorgängen in Frage kommen.

3.2. Zeitabhängigkeit der Wirkung in Beziehung zur Photoinduktion

Aus den gleichen Gründen und mit dem gleichen Versuchsansatz wie bei Distamycin (Abschnitt 2.2) wurde die Wirkung von Tubercidin bei Applikation zu verschiedenen Zeiten vor bzw. nach Lichtbeginn geprüft. Das Ergebnis zeigt (Abb.4), daß auch Tubercidin die Pigmentsynthese schon nicht mehr vollständig unterdrücken kann, wenn es 10 min nach Belichtungsbeginn zugegeben wird.

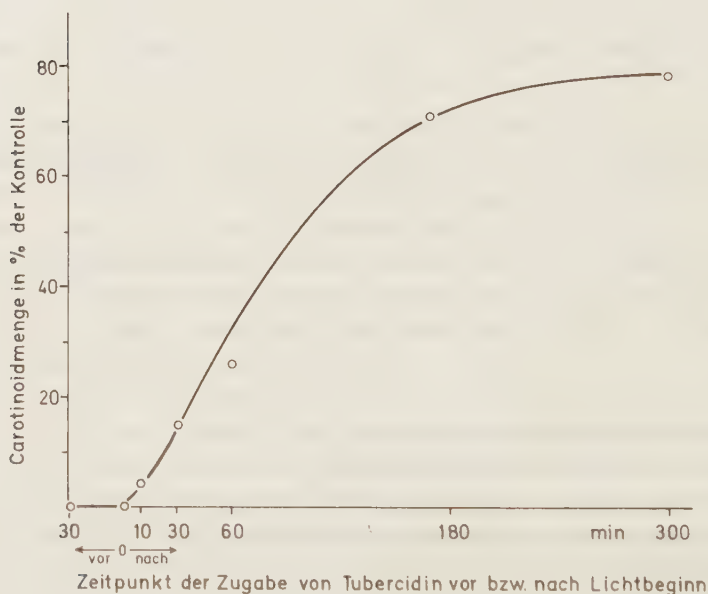


Abb. 4: Hemmung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese durch Tubercidin (10^{-4} M), das verschiedene Zeiten vor oder nach Belichtung zugegeben wurde; die Bestimmung der Farbstoffmenge erfolgte 24 h nach Lichtbeginn.

Die noch bei Zusatz 3 bzw. 5 Stunden nach Lichtbeginn festzustellende Hemmung der Farbstoffsynthese dürfte ähnliche Ursachen haben wie sie bereits bei den Befunden mit Distamycin erwähnt wurden (Abschnitt 2.2).

3.3. Verhinderung der Hemmung durch Adenosin

Wenn die vollständige Hemmung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese in *Fusarium aquaeductuum* durch Tubercidin dadurch zustande kommt, daß Tubercidin anstelle von Adenosin in die durch Lichtinduktion möglicherweise neugebildete RNS eingebaut wird, müßte nach einer Vorinkubation mit Adenosin die Hemmwirkung aufgehoben werden können.

Um diese Annahme zu überprüfen wurde 60 min vor Lichtbeginn zu je 100 ml Pilzsuspension Adenosin bis zu einer Endkonzentration von $7,5 \times 10^{-3}$ M gegeben und 30 min vor Belichtung Tubercidin zugesetzt; die Belichtungsdauer betrug 30 min, die Nachreaktionszeit im Dunkeln 24 Stunden.

Konzentration Tubercidin	10^{-4} M		3×10^{-4} M		10^{-3} M	
Adenosin ($7,5 \times 10^{-3}$ M)	- Ad.	+ Ad.	- Ad.	+ Ad.	- Ad.	+ Ad.
Carotinoidmenge in % der Kontrolle	0,2	100	0	102	0	96

Tab.3: Verhinderung der Tubercidinhemmung durch Adenosin.
Adenosin und Tubercidin wurden 60 bzw. 30 min vor Lichtbeginn appliziert; die Bestimmung der Carotinoidmenge erfolgte nach 24 h.

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, wird durch eine Vorinkubation mit Adenosin die totale Blockierung der lichtinduzierten Pigmentbildung durch Tubercidin noch bei einer Hemmstoffkonzentration von 3×10^{-4} M vollständig und bei 10^{-3} M nahezu aufgehoben.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Befunden von Mc Cullough et al. (1972) an *Chlorella pyrenoidosa* und von Fouquet et al. (1975) an *Physarum polycephalum*; beide Arbeitsgruppen konnten nämlich ebenfalls mit Adenosin die Wirkung der Adeninanaloga Cordicepin bzw. 6-Methyl-Purin unterbinden, wenn Adenosin vor Zugabe der Antimetabolite den Organismen verabreicht wurde.

4. Vergleich der Wirkung von Hemmstoffen der Transkription und Translation

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, ist für die Relevanz von Schlußfolgerungen, die aus Ergebnissen unter Verwendung von Hemmstoffen gezogen werden, der Nachweis der Spezifität der Wirkung eines Hemmstoffes sehr wichtig; im Falle der lichtinduzierten Carotinoidsynthese kommt dabei einem Vergleich der Wirkung von Distamycin und Tubercidin mit derjenigen des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid besondere Bedeutung zu.

Abbildung 5 zeigt, daß alle 3 Hemmstoffe eine sehr ähnliche Konzentrationsabhängigkeit ihrer Wirkung auf die lichtinduzierte Carotinoidsynthese haben. Im Verhältnis zu den in Untersuchungen anderer Autoren angewandten Hemmstoff-Konzentrationen (z.B. Mohr und Senf, 1966; Goodwin et al., 1966) liegen die in den vorliegenden Versuchen verwendeten Konzentrationen von Distamycin und Tubercidin durchaus in einem vertretbaren physiologischen Bereich.

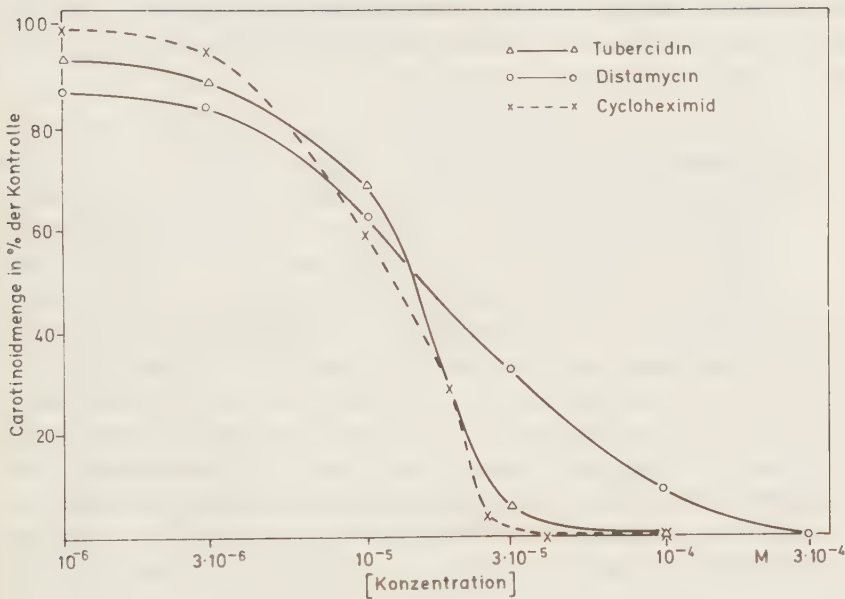


Abb.5: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese durch Distamycin, Tubercidin und Cycloheximid. Werte für Distamycin aus Abb.1, für Tubercidin aus Abb.3, für Cycloheximid nach Rau (1967b).

Ein Vergleich der Zeitabhängigkeit der Wirkungen von Transkription- und Translationshemmstoffen (Abb.6) gibt bereits einen ersten Anhaltspunkt für die spezifische Wirkung von Distamycin und Tubercidin: Vor allem verdeutlichen die Werte in den ersten 30 min nach Lichtbeginn, daß die Hemmung der Carotinoidsynthese durch diese Substanzen zeitlich früher abnimmt als diejenige durch Cycloheximid; daraus kann geschlossen werden, daß vor einer lichtinduzierten de novo-Synthese von carotinoidbildenden Enzymen auch schon die

Bildung einer spezifischen RNS photoreguliert sein muß. Weitere Versuche, die diese Annahme untermauern sollen, werden im nächsten Kapitel beschrieben.

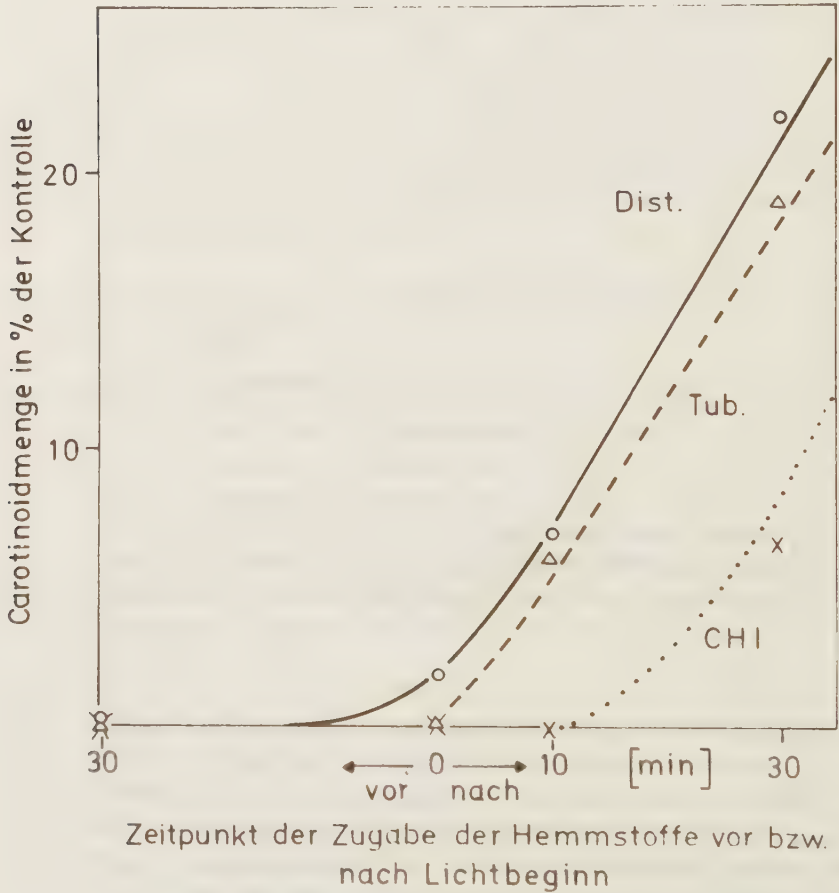


Abb.6: Zeitabhängigkeit der Hemmung der lichtinduzierten Carotinoidsynthese durch Distamycin (Werte aus Abb.2), Tubercidin (Werte aus Abb.4) und Cycloheximid (nach Rau and Rau-Hund, 1977).

II. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf die Nukleinsäure- und Proteinsynthese.

Der Einbau von radioaktivem Uridin bzw. Leucin in RNA bzw. Proteine wird häufig als Maß für die Syntheserate der entsprechenden Makromoleküle verwendet. Um den Einbau dieser markierten Vorstufen in bestimmte Stoffe der Zelle exakt messen zu können, müssen nach der Inkubation mit der betreffenden Substanz die entsprechenden Zellbestandteile isoliert, gereinigt und dann ihre spezifische Radioaktivität gemessen werden. Diese Methode ist sehr arbeitsaufwendig und führt deshalb z.B. bei Kinetiken mit vielen Meßpunkten und mehreren Parallelen zu einem hohen Zeitbedarf pro Versuch. Aus diesem Grund wird häufig bei submers wachsenden Organismen als relatives Maß für den Einbau einer von außen angebotenen Substanz die Zunahme der Radioaktivität in den ganzen Zellen (im Falle von Pilzen diejenige des Mycels) genommen. Diese vereinfachte Methode berücksichtigt aber vor allem 2 Fehlermöglichkeiten nicht: Zum ersten bleiben aufgenommene Moleküle unverarbeitet im Protoplasma oder Zellsaft liegen, es wird also nicht der Einbau sondern tatsächlich nur die Aufnahme in die Zelle gemessen; zum anderen ist selbst bei einem Einbau der Substanz nicht gewährleistet, daß sie ausschließlich in diejenigen Zellbestandteile eingebaut wird, für die sie üblicherweise als Vorstufe gilt.

Um diese beiden Fehlermöglichkeiten weitgehend zu vermeiden und trotzdem den Arbeitsaufwand zu begrenzen, wurde im ersten Teil der folgenden Experimente versucht, "Aufnahme ins Mycel" und "Einbau" durch Behandlung des Mycels vor der Radioaktivitätsbestimmung mit Trichloressigsäure (TCA) zu trennen (Toennessen and Friesen, 1973). Diese Methode basiert auf folgender Überlegung: Durch TCA entsprechender Konzentration werden die Hyphen abgetötet, die Plasmagrenzschichten

permeabel und gleichzeitig die festen Zellbestandteile koaguliert; dadurch sollte mindestens ein Teil der zwar in die Zelle aufgenommenen, aber nicht eingebauten Substanzen extrahiert werden und die im TCA-unlöslichen Material verbleibende Radioaktivität dem tatsächlichen exakten Einbau näherkommen. Zur Sicherung der so gewonnenen Ergebnisse unter Vermeidung beider oben angeführten Fehlermöglichkeiten wurden zusätzlich in einigen repräsentativen Versuchsansätzen nach der Inkubation des Mycels mit der entsprechenden Substanz die Nucleinsäuren bzw. Proteine isoliert, ihre spezifische Radioaktivität bestimmt und mit dem "Einbau in das TCA-unlösliche Material" verglichen.

1. Methoden

1.1. Versuchsdurchführung

Aus Vorversuchen ergab sich, daß die für eine Blockierung der Carotinoidsynthese ausreichende Distamycin- bzw. Tubercidin-konzentration bei entsprechender Myceldichte den Uridin- bzw. Leucineinbau nicht vollständig hemmte (vergl. Abschnitt II.3.2.). Um aber für den eindeutigen Nachweis der Spezifität eine vollkommene Hemmung zu erreichen, wurde bei gleicher molarer Konzentration der Inhibitoren die Myceldichte erniedrigt. Dazu wurde das Mycel aus 50 ml Submerskultur abgesaugt, mehrmals gespült und mit der jeweiligen Nährlösung (PG bzw. FYG) auf 75 ml aufgefüllt. Aus diesen "Stammsuspensionen" wurden Aliquots entnommen, mit PG-Lösung bzw. FYG-Nährboden auf das 10-fache verdünnt und Chloramphenicol (zur Verhinderung von Bakterienwachstum) zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml, sowie unmarkiertes Uridin bzw. Leucin (Endkonzentration 5×10^{-5} bzw. 8×10^{-3} M) zugesetzt. Bei Verwendung von FYG-Nährboden wurden die letzteren Konzentrationen auf 2×10^{-5} M Uridin bzw. 3×10^{-3} M Leucin gesenkt, da sonst kein genügend hoher Einbau von Radioaktivität gemessen werden konnte; der Grund dafür dürfte in der Verdünnung der radioaktiven Stoffe durch Substanzen im Nährboden liegen.

Um die Stoffwechselvorgänge im Pilzmycel an das neue Milieu anzugleichen, wurde dieser Versuchsansatz in einem Erlenmeyerkolben zunächst mindestens 30 min unter leichtem Schütteln in einem Wasserbad bei 22°C gehalten und erst dann erfolgte die Zugabe der entsprechenden radioaktiven Substanzen. 120 min danach wurde die Mycelsuspension gleichmäßig auf zwei Erlenmeyerkolben verteilt und eine Hälfte mit dem jeweiligen Hemmstoff bis zur angegebenen Endkonzentration versetzt. Sofort nach der Radioaktivitätszugabe und zu verschiedenen weiteren Zeiten wurden zwei Parallelproben von jeweils 5 ml Suspension entnommen, in je 5 ml eiskalte 20 %ige TCA gebracht und die Mischung kurzzeitig gequirlt.

Das TCA-Pilzgemisch wurde dann auf einer Metallfritte über Whatman-GF/C-Filter ($\varnothing$ 2,4 cm) abgenutscht, zweimal mit je 10 ml 10 %iger eisgekühlter TCA und zweimal mit je 10 ml 70 %igem eiskaltem Äthanol nachgespült. Die Filterplättchen wurden 1 Stunde bei 40°C getrocknet und in Szintillationsgläsern mit je 10 ml Toluol-butyl-PBD (7 g/l Toluol) eingelegt. Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler (Betazint BF 5000, Flüssigszintillationsspektrometer der Firma Berthold und Friesseke) auf 2 % Fehler bestimmt.

Bei den "Doppelmarkierungsversuchen" (gleichzeitiger Einsatz der Isotope ^3H und ^{14}C) erfolgte eine Quenchkorrektur insoweit, als die Diskriminatoreinstellung am Szintillationszähler so gewählt wurde, daß der overspill auf 1 % ^3H im ^{14}C -Kanal und 3 % ^{14}C im ^3H -Kanal begrenzt war (Schrott, 1973).

Zum Vergleich wurde die Aufnahme der radioaktiven Substanzen ins Mycel folgendermaßen gemessen: Aliquote wurden statt in TCA in die gleiche Menge eiskalten destillierten Wassers pipettiert, viermal mit je 10 ml eiskaltem Wasser vom Versuchsmedium freigespült und die Radioaktivität in gleicher Weise wie bei den TCA-behandelten Proben bestimmt.

Zur Überprüfung, ob eine ausreichende Versorgung des Mycels mit den entsprechenden Vorstufen über den gesamten Versuchszeitraum gewährleistet war, wurde bei jeweils einem Versuch einer bestimmten Versuchsanstellung die noch vorhandene Menge an Radioaktivität in der Inkubationslösung gemessen. Dafür wurde das Mycel aus Proben von 0,5 ml vom Versuchsmedium abgenutscht, dreimal mit je 5 ml eiskaltem dest. H_2O , dreimal mit je 10 ml eiskalter 10 %iger TCA und zweimal mit je 10 ml eisgekühltem 70 %igem Alkohol gespült. Die Radioaktivitätsbestimmung von jeweils 0,1 ml Versuchsmedium (Filtrat) bzw. Waschwasser erfolgte in je 10 ml Dioxan-Cocktail (1 l Dioxan, 100 g Naphthalin, 5 g PPO) im Szintillationszähler.

In allen Fällen betrug die am Ende der Inkubationszeit vorhandene Radioaktivitätsmenge noch mindestens 40 % der zu Beginn verabreichten Aktivität.

1.2. Isolierung, Reinigung und quantitative Bestimmung der Nucleinsäuren.

Das Mycel einzelner Proben wurde aus der Inkubationslösung abgenutscht, dreimal mit je 10 ml eiskaltem dest. H_2O gewaschen und sofort in Trockeneis eingefroren; eine Lyophilisierung der Pilzhyphen erübrigte sich, wenn das Mycel über Nacht weiter in Trockeneis gehalten wurde. Die in den folgenden Abschnitten beschriebene Variante der Phenolextraktion erfolgte in geringfügiger Abweichung nach Schrott (1973).

In einer vorgekühlten Reibschale wurde das Mycel mit 5 g Seesand und 500 mg Bentonit pulverisiert, wobei die Eigenschaft von Bentonit als stark quellbarer Substanz dazu genutzt wurde, um Proteine zu adsorbieren und so die Nucleaseaktivität zu blockieren (Kirby, 1965; Solymosy et al., 1968).

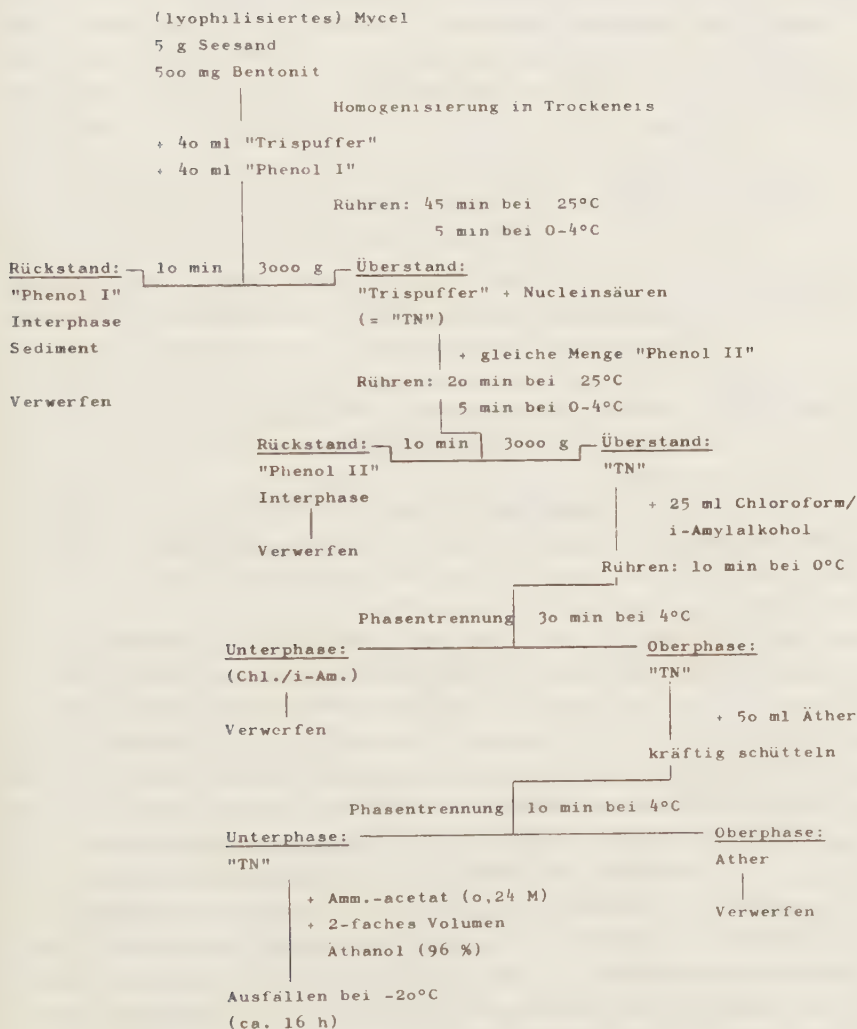


Abb.7: Flußdiagramm für die Extraktion und Reinigung von Nucleinsäuren.

Der Auszug der Nucleinsäuren aus dem pulverförmigen Material (siehe Flußdiagramm in Abb.7) erfolgte durch drei verschiedene Extraktionsmedien:

"Trispuffer": Tris-HCl 0,1 M; pH 8,4
NaCl 0,7 M
EDTA 0,01 M
SDS 2 %
SAS 1 %

"Phenol I": Phenol bei 66°C gelöst und mit dest. H₂O gesättigt, zuzüglich 0,1 % 8-Hydroxychinolin

"Phenol II": Phenol I und frisch destilliertes m-Kresol im Verhältnis 50 : 7 (v/v)

Die kationenaktiven Detergentien SDS und SAS inaktivieren Proteine und schützen so die Nucleinsäuren vor dem Angriff abbauender Enzyme. In Gegenwart von SAS werden außerdem DNS und schnellmarkierte RNS aus dem Zellkern extrahiert (Kirby, 1965; Loening, 1967). SDS lysiert ferner Zellwände und Lipidmembranen (Solymosy et al., 1968), wodurch mechanisch nicht aufgeschlossene Zellen ebenfalls in den Extraktionsprozeß einbezogen werden. "Phenol I" wirkt durch den Phenolanteil und zusätzlich durch das verstärkende Reagenz 8-Hydroxychinolin vornehmlich de-proteinisierend. Durch die Sättigung des Phenols mit Wasser anstatt mit Puffer (Schrott, 1973) wird der nucleinsäurehaltigen Pufferphase während der Reinigung weniger Flüssigkeit entzogen und somit der Verlust an Nucleinsäuren vermindert. m-Kresol verringert weiterhin die Proteinkontamination und verhindert zudem ein Kristallisieren des Phenols bei niedrigen Arbeitstemperaturen (Kirby, 1965). Zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit wurden die Suspensionen entsprechend den Erfahrungswerten 45 bzw. 20 min bei Zimmertemperatur gerührt und dann auf 0-4°C abgekühlt.

Bei dieser Temperatur wird der in der phenolischen Phase gelöste Pufferanteil verringert und damit die Nucleinsäureausbeute erhöht. Während der Zentrifugationen erfolgt die Trennung der Pufferphase mit den gelösten Nucleinsäuren vom phenolhaltigen Rückstand aus Zelltrümmern, gefällten Proteinen und anderen nicht wasserlöslichen Substanzen.

Das Chloroform/1-Amylalkohol-Gemisch diente zur Befreiung der Pufferphase von Phenolverunreinigungen und zur weiteren Deproteinisierung; zudem verhindert 1-Amylalkohol das Schäumen der Lösung während des Arbeitsprozesses, wodurch Oxydationsvorgänge weitgehend vermieden werden. Die restlichen Chloroformverunreinigungen konnten aus dem Puffer mit Äther gelöst werden. Zur weiteren Verarbeitung mußten die Nucleinsäuren ausgefällt werden. Dies geschah durch Zugabe von 0,24 M Ammoniumacetat und eiskaltem Äthanol; Ammoniumacetat soll dabei zur quantitativen Präcipitation der Nucleinsäuren aus sehr verdünnten Lösungen dienen und ein Mitausfällen der Detergentien weitgehend vermeiden (Osterburg et al., 1975).

Die ausgefällten Nucleinsäuren wurden 10 min bei $3000 \times g$ zentrifugiert, vom Überstand befreit, dreimal vorsichtig mit je 10 ml eiskaltem 96 %igem Äthanol gespült und kurz mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe getrocknet. Der Rückstand wurde dann in 20 ml Sörensenpuffer (0,05 M, pH 6,7; $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaCl}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl}$) gelöst und durch 30-minütiges Zentrifugieren bei $10000 \times g$ von denaturierten Bestandteilen getrennt. Ein nochmaliges Ausfällen mit Äthanol erbrachte keinen größeren Reinheitsgrad. Die Reinheitsbestimmung geschah anhand des UV-Spektrums der glasklaren Lösung gegen Sörensenpuffer als Blindwert (Solymosy et al., 1968; Yuyama and Zimmermann, 1972) und des $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Quotienten, der um 2,1 lag (Solymosy et al., 1968; Osterburg et al., 1975).

Der Einbau von ^{14}C -Uridin in die Nucleinsäuren sollte an der Zunahme der spezifischen Radioaktivität in den isolierten Makromolekülen beobachtet werden. Dazu war eine Mengenbestimmung notwendig. Sie erfolgte anhand des OD_{260} -Wertes (Fouquet et al., 1975; Fraser, 1975; Dahnke, 1975), wobei die Menge in mg/ml aus einer Eichkurve mit RNS aus Hefe (linear von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 100 $\mu\text{g/ml}$) ermittelt wurde. Eine OD-Einheit von 1,2 bei Raumtemperatur entsprach danach 50 μg Nucleinsäuren (Yuyama and Zimmermann, 1972).

1.3. Radioaktivitätsmessung in isolierten Nucleinsäuren

Um auch geringe Aktivitäten messen zu können, mußten die Nucleinsäuren wieder aus der Lösung ausgefällt werden (Schrott, 1973). Dies geschah mit den Fällungsmitteln TCA (Yuyama and Zimmermann, 1972; Schrott, 1973; Fouquet et al., 1975), CTAB (Hennig et al., 1971; Morimoto et al., 1974) und Äthanol (Fouquet et al., 1975). Für jede Praecipitation wurden drei Parallelproben von je 2 ml Nucleinsäurelösung (OD_{260} ca. 0,3-0,7) angesetzt:

	<u>CTAB</u>	<u>TCA</u>	<u>Äthanol</u>
<u>Ansatz:</u>	2 ml NS 0,24 M Amm.-ac. 400 μg RNS (Hefe) 2 ml CTAB (2 %)	2 ml NS 0,24 M Amm.-ac. 400 μg RNS (Hefe) 2 ml TCA (10 %)	2 ml NS 0,24 M Amm.-ac. 5 ml eiskalter Äthanol (96 %)
<u>Fällung:</u>	2-3 h bei Raumtemperatur	über Nacht im Kühlschrank	über Nacht bei -20°C
<u>Filter:</u>	Whatman GF/C	Sartorius, SM 113 06	Whatman GF/C
<u>Nachbehandl.:</u>	3 x mit je 5 ml kaltem dest. H_2O , trocknen;	3 x mit je 5 ml eiskalter TCA (10 %), trocknen;	3 x mit je 5 ml eiskaltem Äthanol (96 %), trocknen;

Die getrockneten Filterplättchen wurden in Toluol-butyl-PBD, Aliquote der Filtrate im Dioxan-Cocktail gemessen.

1.4. MAK-Chromatographie der Nucleinsäuren

Methyliertes Albumin wurde nach Mandell and Hershey (1960) folgendermaßen hergestellt: 5 g Rinderserumalbumin werden in 500 ml Methanol suspendiert und langsam mit 4,2 ml 12 n HCl versetzt. Das Gemisch verbleibt unter gelegentlichem Schütteln drei Tage im Dunkeln. Das Praecipitat wird abzentrifugiert und je zweimal mit Methanol und wasserfreiem Diäthyläther gewaschen, pulverisiert und im Exikkator über KOH aufbewahrt.

Die säulenchromatographische Trennung der Nucleinsäuren geschah nach Schrott (1973) in einer Modifikation der Methode von Mandell and Hershey (1960):

Für eine Säulenfüllung wurden 15 g Hyflo-Super-Cel in 75 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 6.7) mit 0,4 M NaCl kurz aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit 3,75 ml einer 1 %igen wäßrigen Lösung von methyliertem Albumin versetzt; die Adsorption des Esters dauerte mindestens 3 Stunden, wobei die Suspension mehrmals geschüttelt wurde.

Eine doppelwandige Chromatographiesäule wurde mittels durchfließendem Wasser ständig auf einer Temperatur von 30°C gehalten. Zum Schutz der Glasfritte (G4) wurde die Säule zunächst ca. 1 mm hoch mit einer Aufschlämmung von Zellulose (Machery und Nagel, MN2 100) in dest. Wasser und dann schrittweise mit je 5 ml der MAK-Suspension gefüllt. Der Druck einer Perexpumpe diente zur Verdrängung des überstehenden Puffers und damit zur festen Packung der Säulenfüllung. Das MAK-Material wurde dann mit ca. 80 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,7, mit 0,25 M NaCl (Startpuffer) von UV-absorbierenden Bestandteilen befreit.

Für die Auftrennung an der MAK-Säule wurden die durch Äthanol gefällten Nucleinsäuren einer Probe in 5 ml Startpuffer resuspendiert und 30 min bei 110 000 × g zentrifugiert.

Vom glasklaren Überstand wurden 4 ml (ca. 0,4-0,6 mg Nucleinsäuren) zur Chromatographie und 1 ml in geeigneter Verdünnung zur Bestimmung des OD_{260} -Wertes und der Radioaktivität (nach Ausfällen mit Alkohol) der Gesamtnucleinsäuren verwendet.

Die Elution nach Auftragen der Nucleinsäuren und Waschen mit 20 ml Startpuffer geschah mit einem linearen Gradienten von 0,375-1,375 M NaCl in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.7. Die Gradientenherstellung erfolgte in einem neunkammerigen Mischer (Boskamp Variograd) mit jeweils um 0,125 ansteigender Kochsalzmolarität (30 ml Puffer pro Kammer). Die Säule wurde unter dem Druck einer Perpexpumpe (LKB; 80 ml/h) entwickelt. Die Absorptionsmessung erfolgte in einer Durchflußküvette (bei 254 nm) des LKB Uvicord II mit Fallbügelschreiber; Fraktionen von jeweils 5 ml wurden am angeschlossenen LKB-Fraktionskollektor gesammelt. Nach dem Durchlauf der letzten UV-absorbierenden Pufferfraktionen wurde die Säule mit ca. 30 ml 1 M NH_4OH nachgewaschen um auch die adeninreiche TB-RNS (Ellen and Sheridan, 1964) abzulösen.

Da sich das Säuleneluat mit keiner der gängigen Szintillationsflüssigkeiten mischte, und die oft geringen Aktivitäten ein möglichst großes Aliquot zur Messung der Radioaktivität erforderten, mußten die Nucleinsäuren wiederum aus den Fraktionen gefällt werden. Dabei hat sich CTAB jedoch bei hohen Kochsalzkonzentrationen als ungeeignetes Fällungsmittel erwiesen. Die Praecipitation erfolgte deshalb nach Zugabe von 1 mg carrier-RNS (aus Hefe) pro Fraktion mit eiskalter TCA (10 % Endkonz.). Nach 30-60 min im Eisbad wurde der Niederschlag auf Membranfilter (Sartorius, SM 11306) abgenutscht und bei 40°C getrocknet. Die Radioaktivität wurde in Toluol-butyl-PBD-Cocktail in der üblichen Weise ermittelt.

1.5. Extraktion und quantitative Bestimmung der löslichen Proteine

Da sich die Proteinextraktionen nach Valadon and Mummery (1971) bzw. Ferrari and Widholm (1973) für *Fusarium aquaeductuum* als ungeeignet erwiesen, wurde die Isolierung der löslichen Proteine in Abänderung nach Schrott (1973) vorgenommen. Das Mycel wurde wie in Abschnitt II, 1.2., geschrieben bis zur weiteren Aufarbeitung in Trockeneis eingefroren. Die Mazerierung der Zellen erfolgte entweder 15 min lang in einer eisgekühlten Reibschale mit ca. 2 g Seesand und 20 ml Puffer P (10 mM Phosphatpuffer, pH 7.5; 3 mM $MgCl_2$; 5 mM 2-Mercaptoäthanol) oder durch einen Ultraschall-Desintegrator (Branson "Sonifier"); dabei wurde das Mycel mit 6 ml Puffer P in einem eisgekühlten Labyrinthgläschen 6 min zerschallt und das Homogenat mit 14 ml Puffer P verdünnt. Die weitere Behandlung erfolgte einheitlich folgendermaßen:

Nach 30-minütiger Zentrifugation bei $14\,000 \times g$ wurde der Überstand von Fettpartikeln befreit und nochmals 60 min bei $110\,000 \times g$ zentrifugiert. Dieser Überstand wurde anschließend mit 80 % Ammoniumsulfat (5,61 g/ml) versetzt und 30 min im Eisbad gerührt. Das Praecipitat der Ammoniumsulfatfällung erhielt man nach einer weiteren Zentrifugation von 20 min bei $20\,000 \times g$; es wurde in 20 ml Puffer P aufgelöst und durch 30 min langes Zentrifugieren bei $110\,000 \times g$ von irreversibel gefällten Proteinen befreit. Die Aufarbeitung der Proteine erfolgte bei einer Temperatur von $0-4^\circ C$.

Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität war die Ermittlung der Proteinkonzentration notwendig; diese erhielt man durch Trübungsmessung nach Fällern mit TCA (Wacker et al., 1970). Hierzu wurden 1 ml Proteinlösung mit 1,5 ml 10 %iger TCA versetzt und die Extinktion nach 30 sec bei 450 nm gemessen; die Proteinmengen ließen sich aus einer Eichkurve mit Rinder-serumalbumin in Puffer P (linear von 0,1 mg/ml bis 3 mg/ml) ermitteln.

Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden 3 Parallelproben von je 5 ml Proteinlösung mit der doppelten Menge an 10 %iger TCA versetzt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Die gefällten Proteine wurden dann auf Whatman GF/C-Filter abgenutscht, mit eiskalter 10 %iger TCA und 70 %igem Alkohol gewaschen und in der üblichen Weise für die Szintillationsmessung vorbereitet.

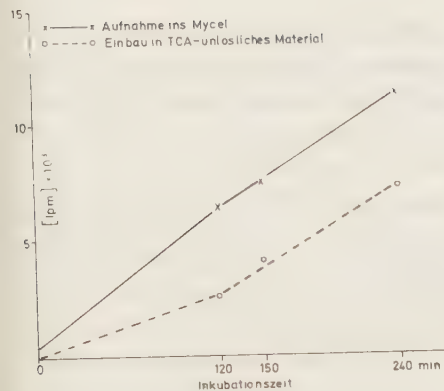
2. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf den Einbau von Uridin bzw. Leucin in das Mycel (TCA-unlösliches Material)

2.1. Vergleich von Aufnahme und Einbau in TCA-unlösliches Material

Vorab sollte der Zusammenhang zwischen "Aufnahme" und "Einbau in TCA-unlösliches Material" von radioaktiv markierten Substanzen, die dem Mycel angeboten wurden, untersucht werden; damit konnten gleichzeitig die in den Vorbemerkungen zu Kapitel II gemachten Annahmen geprüft werden.

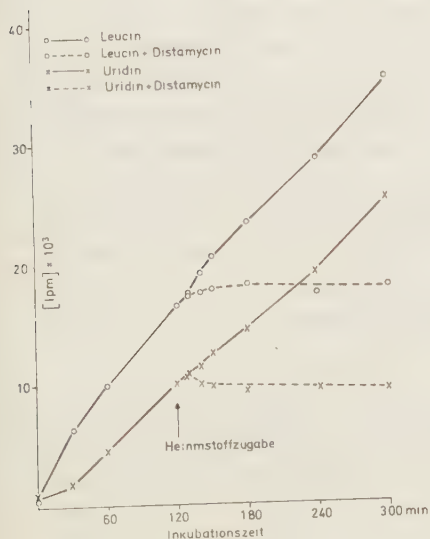
Für die Versuche wurden zu verschiedenen Zeiten Parallelproben aus dem Inkubationsmedium entnommen, die eine mit dest. Wasser ("Aufnahme ins Mycel"), die andere mit TCA ("Einbau ins Mycel bzw. in TCA-unlösliches Material") gewaschen und jeweils die verbleibende Radioaktivität bestimmt. Als Beispiel für die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 8 Aufnahme und Einbau von ^{14}C -Uridin dargestellt.

Obwohl sich eine deutliche Korrelation zwischen Aufnahme ins Mycel und Einbau in säurefällbare Substanzen zeigte, lag die aufgenommene Menge an radioaktiver Vorstufe doch erheblich über der inkorporierten. Dieses Resultat bestätigte also die Annahme, daß durch TCA-Behandlung des Pilzmateri als die verbleibende Radioaktivität dem tatsächlichen Einbau weit näher kommt als eine bloße Aufnahme der markierten Substanz ins Mycel. Ähnliche Beziehungen stellten auch Francki et al. (1971) bei der Inkubation von Tabakzellen mit ^{14}C -Leucin bzw. ^{14}C -Uridin fest.



2.2. Die Wirkung von Distamycin

Das Pilzmycel wurde zunächst in getrennten Versuchen mit ^{14}C -Uridin bzw. ^{14}C -Leucin inkubiert und deren Einbau in TCA-unlösliches Material unter dem Einfluß von Distamycin gemessen.



Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß in den Kontrollen Uridin und Leucin über den ganzen Versuchszeitraum mit konstanter Rate eingebaut werden. Aus dieser Abbildung ist ebenfalls deutlich zu ersehen, daß Distamycin den ^{14}C -Uridineinbau in TCA-unlösliches Material bereits 10 min nach seiner Applikation - wahrscheinlich aber schon nach kürzerer Zeit - merklich, und spätestens 20 min danach vollständig hemmt. Der Leucineinbau hingegen wird erst 20 min nach Distamycinzugabe erkennbar beeinträchtigt; eine vollständige Hemmung tritt frühestens nach 30 min ein.

Die zeitliche Verschiebung in der Hemmung von Uridin- und Leucineinbau durch den Transkriptionsinhibitor wurde ganz besonders deutlich in "Doppelmarkierungsversuchen" bei denen das Pilzmycel gleichzeitig mit ^{14}C -Uridin ^3H -Leucin inkubiert wurde. Abb. 10 zeigt, daß gerade unter identischen Inkubationsbedingungen der Einbau von ^{14}C -Uridin in ein säurefällbares Produkt erheblich vor dem Einbau von ^3H -Leucin unterbunden wird.

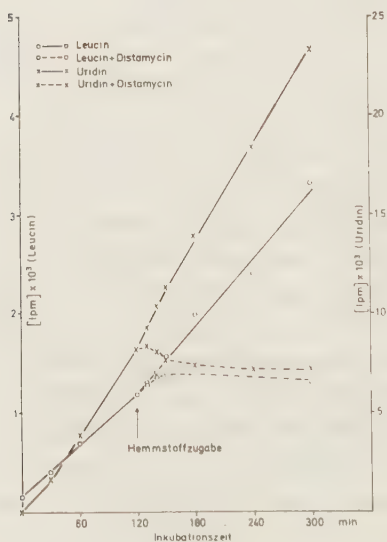


Abb. 10:

"Doppelmarkierungsversuch":

Vergleich des Verlaufs von ^{14}C -Uridin- und ^3H -Leucineinbau in TCA-unlösliches Pilzmaterial vor und nach Zugabe von Distamycin (Endkonzentration 3×10^{-4} M).

Inkubationsmedium: PG-Lösung.

Radioaktivität: 0,05 $\mu\text{Ci/ml}$

U- ^{14}C -Uridin, 2,3 $\mu\text{Ci/ml}$

G- ^3H -Leucin.

Aus diesen Ergebnissen können wir die Folgerung ziehen, daß Distamycin auch in *Fusarium aquaeductuum* zunächst als Hemmstoff der Transkription wirkt, und die Proteinsynthese erst als Folge davon beeinflußt wird.

2.3. Die Wirkung von Tubercidin

In gleicher Weise wie bei Zugabe von Distamycin wurde mit Hilfe der Einbaukinetik von radioaktivem Uridin und Leucin in TCA-unlösliches Pilzmaterial die Wirkung von Tubercidin als Antimetabolit der Nucleinsäuresynthese geprüft. Als Beispiel für die erzielten Befunde gibt Abbildung 11 das Ergebnis von "Doppelmarkierungsversuchen" wider. Trotz gleicher Versuchsbedingungen wird der Einbau von ^{14}C -Uridin praktisch sofort, der von ^3H -Leucin aber erst 20-30 min nach Hemmstoffzugabe blockiert.

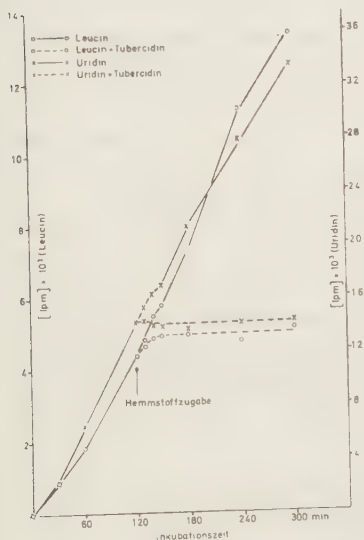


Abb.11:

"Doppelmarkierungsversuch":
Vergleich des Verlaufs von ^{14}C -Uridin und ^3H -Leucineinbau in TCA-unlösliches Pilzmaterial vor und nach Zugabe von Tubercidin (Endkonzentration 3×10^{-4} M).

Inkubationsmedium: PG-Lösung.

Radioaktivität: 0,05 $\mu\text{Ci/ml}$

U- ^{14}C -Uridin, 2,30 $\mu\text{Ci/ml}$

G- ^3H -Leucin.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen bei der Verwendung von Basenanaloga als Inhibitoren. So konnte bei der Applikation von Tubercidin

(Acs et al., 1964) und 5-Azacytidin (Reichman and Penman, 1973), wie auch von Cordycepin (3-Deoxyadenosin; Delseny et al., 1975) eine rasche und starke Hemmung der Proteinsynthese in jedem Fall als Sekundäreffekt einer gestörten RNS-Synthese nachgewiesen werden.

Der zeitliche Unterschied in der Hemmung des Einbaus von Uridin und Leucin kommt auch dann sehr deutlich zum Ausdruck, wenn man aus der Zunahme der Radioaktivität mit und ohne Hemmstoff in den ersten 30 min nach Zugabe des Inhibitors die prozentuale Hemmung berechnet. In Tabelle 4 sind diese Werte für Tubercidin und Distamycin zusammengestellt.

	Einbau von ^{14}C -Uridin						Einbau von ^{14}C -Leucin					
	^{14}C -Uridin			^{14}C -Leucin			^{14}C -Uridin			^{14}C -Leucin		
Inkub. zeit	Tub.-Konz.: M 0 3×10^{-4}			Tub.-Konz.: M 0 3×10^{-4}			Dist.-Konz.: M 0 3×10^{-4}			Dist.-Konz.: M 0 3×10^{-4}		
min	cpm	cpm	% Hem.	cpm	cpm	% Hem.	cpm	cpm	% Hem.	cpm	cpm	% Hem.
0-10	1066	37	97	446	285	36	768	395	48	858	634	26
10-20	916	--	100	683	221	68	534	--	100	1864	439	76
20-30	691	--	100	265	42	84	1211	--	100	1257	152	88

Tab.4: Die Wirkung von Tubercidin und Distamycin auf den Einbau von ^{14}C -Uridin und ^{14}C -Leucin in TCA-unlösliches Pilzmaterial. Die angegebene Radioaktivität stellt die über die Vorinkubation (2 h) hinaus im jeweiligen Zeitraum inkorporierte Menge dar.

Inkubationsmedium: PG-Lösung.

Radioaktivität: 0,045 $\mu\text{Ci/ml}$ U- ^{14}C -Uridin,
0,045 $\mu\text{Ci/ml}$ U- ^{14}C -Leucin.

Die Beeinträchtigung der RNS-Synthese durch die Basenanaloga Cordycepin (Fouquet et al., 1975) und 6-Methyl-Purin (Mc Cullough and John, 1972) konnte vollkommen aufgehoben werden,

wenn vor oder gleichzeitig mit dem Hemmstoff Adenosin bzw. Adenin im Überschuß appliziert wurde. Da auch die Carotinoidsynthese in *Fusarium aquaeductum* unter ähnlichen Bedingungen selbst durch erhöhte Tubercidinkonzentrationen nicht gehemmt wird (Abschnitt I.3.3.), haben wir zusätzlich untersucht, ob sich diese Wirkung von Adenosin auf eine Konkurrenz mit dem Basenanalogon in der Nucleinsäuresynthese zurückführen läßt.

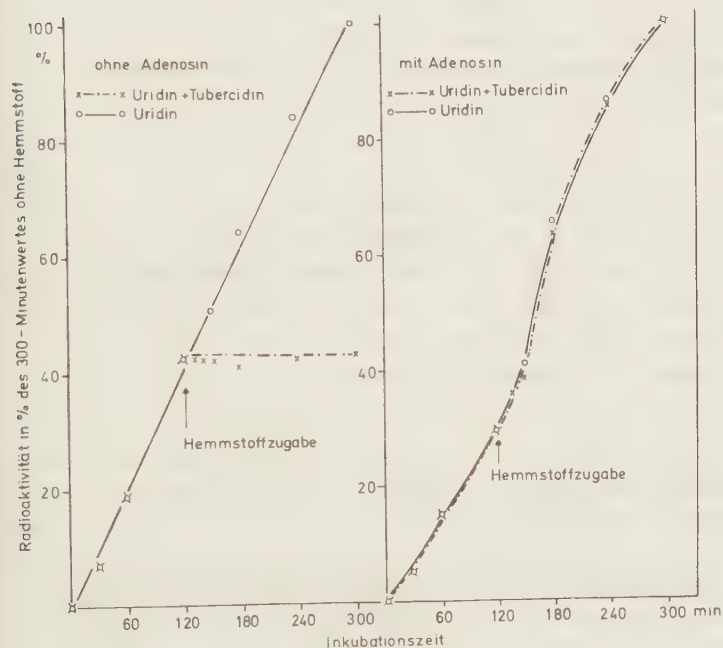


Abb.12: Aufhebung der Tubercidinhemmung durch Adenosin ($7,5 \times 10^{-3}$ M) hinsichtlich des ^{14}C -Uridineinbaus in TCA-unlösliches Pilzmaterial.
 Inkubationsmedium: PG-Lösung.
 Radioaktivität: $0,05 \mu\text{Ci/ml}$ U- ^{14}C -Uridin.

Das Pilzmycel wurde mit Adenosin (Endkonzentration: $7,5 \times 10^{-3}M$) 2 Stunden vorinkubiert und dann erst der Antimetabolit zugegeben. Die Vorinkubation mit Adenosin wurde deshalb vorgenommen, weil aufgrund der raschen Hemmwirkung von Tubercidin anzunehmen ist, daß die Moleküle des Basenanalogen in der Zelle sehr schnell phosphoryliert und in stabile Bestandteile des Nucleinsäurevorstufenpools umgewandelt werden können. Dies scheint nämlich in *Physarum polycephalum* (Fouquet et al., 1975) tatsächlich der Fall zu sein: Adenosin, das vor oder gleichzeitig mit Cordycepin verabreicht wurde, konnte die Hemmung der RNS-Synthese nahezu vollkommen aufheben, während eine Revertierung durch Adenosin-gabe nach der Inhibitorapplikation nicht mehr vollständig möglich war.

Das Ergebnis (Abb.12) läßt klar erkennen, daß der Einbau von radioaktiv markiertem Uridin in TCA-fällbares Pilzmaterial unter Adenosin in keiner Weise mehr von Tubercidin gehemmt wird; demnach scheint auch in diesem Fall ein genügend hoher intrazellulärer Pool an natürlichen Vorstufen eine Beeinträchtigung der Nucleinsäuresynthese durch Basenanaloga zu verhindern.

2.4. Vergleich der Wirkungen von Distamycin/Tubercidin und Cycloheximid

Aus der unterschiedlichen Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf den zeitlichen Verlauf des Einbaus von radioaktiv markiertem Uridin bzw. Leucin in säureunlösliches Pilzmaterial wurde geschlossen, daß beide Inhibitoren primär die Nucleinsäuresynthese blockieren und daß erst als Folge davon eine Hemmung der Proteinsynthese einsetzt. Eine weitere Stütze für diese Folgerung könnte sich ergeben, wenn der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid einen gegenteiligen Effekt auf den Uridin- bzw. Leucineinbau zeigen würde (Morris, 1967).

Die Ergebnisse entsprechender Experimente sind in
Abbildung 13 dargestellt.

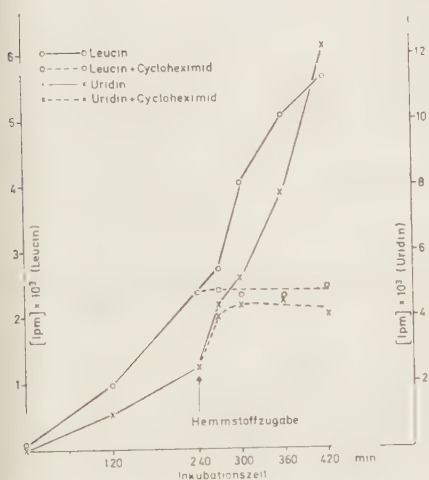


Abb. 13:

Vergleich des Verlaufs von ^{14}C -Uridin- bzw. ^{14}C -Leucin-
einbau in TCA-unlösliches
Pilzmaterial vor und nach
Zugabe von Cycloheximid
(Endkonzentration $6 \times 10^{-5}\text{M}$).
Inkubationsmedium: FYG.
Radioaktivität: $0,17 \mu\text{Ci/ml}$
 $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Uridin bzw. $0,85 \mu\text{Ci/ml}$
 $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Leucin.

Übereinstimmend mit den Resultaten von Feulner (1969) kommt
der Einbau von radioaktiv markiertem Leucin in TCA-unlösliches
Material bereits innerhalb der ersten 30 min nach Cycloheximid-
zugabe nahezu vollständig zum Erliegen. Der Uridineinbau
hingegen läuft noch 60 min lang fast ungehemmt weiter und
kommt erst dann rasch zum Stillstand; möglicherweise tritt
zu diesem Zeitpunkt bereits ein Mangel an nucleinsäuresyntheti-
sierenden Enzymen auf.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den Transkriptionshem-
stoffen (siehe Tabelle 4) ist unter Cycloheximid nun die zu-
nehmende Hemmung beim Leucineinbau in entsprechenden Zeitab-
schnitten jeweils stärker ausgeprägt als beim Uridineinbau
(Tabelle 5):

Inkubationszeit	Einbau von					
	^{14}C -Uridin			^{14}C -Leucin		
	Cyclo.-Konz.:M 0 6×10^{-5}			Cyclo.-Konz.:M 0 6×10^{-5}		
min	cpm	cpm	% Hem.	cpm	cpm	% Hem.
0-30	1885	1530	19	335	31	91
30-60	905	310	66	1365	--	100
60-120	2555	115	96	995	--	100

Tab.5: Die Wirkung von Cycloheximid auf den Einbau von ^{14}C -Uridin und ^{14}C -Leucin in TCA-unlösliches Pilzmaterial. Die angegebene Radioaktivität stellt die über die Vorinkubation (2 h) hinaus im jeweiligen Zeitraum inkorporierte Menge dar.
Inkubationsmedium: FYG.
Radioaktivität: 0,17 $\mu\text{Ci/ml}$ U- ^{14}C -Uridin bzw. 0,085 $\mu\text{Ci/ml}$ U- ^{14}C -Leucin.

3. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf den Einbau von Uridin bzw. Leucin in isolierte Nucleinsäuren und Proteine.

Aus den bisherigen Untersuchungen ergaben sich deutliche Hinweise auf die selektive Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf die Nucleinsäuresynthese in *Fusarium aquaeductum*. Wie aber bereits in der Vorbemerkung zu Kapitel II ausgeführt wurde, mußte nun die Spezifität der Hemmung durch die beiden Substanzen am Einbau in isolierte Nucleinsäuren und Proteine

gezeigt werden. Daß eine als Vorstufe einer bestimmten Stoffklasse bekannte Verbindung auch in andere Produkte eingebaut werden kann, zeigt das Beispiel des Uridin-einbaus: Bereits aus früheren Untersuchungen an *Fusarium* (Rau, unveröffentlicht) war bekannt, daß der Pilz auf Uracil als alleiniger Stickstoffquelle wachsen und es deshalb nach entsprechendem Umbau zur Proteinsynthese verwenden kann; bei *Rhodotorula* wiesen Gianani et al. (1972) und an Rattenleber Sakai and Kihara (1968) bzw. Dahnke (1975) den Einbau von Radioaktivität aus markiertem Uridin in Proteine nach.

3.1. Störung der quantitativen Bestimmung von Nucleinsäuren durch SAS

Als Maß für eine funktionierende Nucleinsäuresynthese kann eine möglichst lineare Zunahme der spezifischen Radioaktivität im gereinigten Extrakt gelten. Da die Mengenbestimmung der Nucleinsäuren nach dem OD_{260} -Wert durch verunreinigendes UV-Material beeinträchtigt wird, wurde zur Reinheitsbestimmung jeweils der Quotient OD_{260}/OD_{280} herangezogen, der um 2,1 liegen soll (Solymosy et al., 1968). Bei einzelnen Proben ergaben sich jedoch Abweichungen bis zu OD_{260}/OD_{280} -Werten von 1,62; entsprechende UV-Spektren zeigten eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 260 nm nach 264-266 nm und zudem eine mehr oder minder stark ausgeprägte Schulter bei 300 nm (Abb.14).

Da diese Abweichungen vom Absorptionsspektrum reiner RNS durch vorsichtiges Waschen des Praecipitats (nach Äthanol-fällung) mit eiskaltem Alkohol verringert werden konnten, schlossen wir auf eine Verunreinigung der Nucleinsäurelösung durch Bestandteile des Extraktionsmediums ("Trispuffer"). Am ehesten schien dafür das benzolkernhaltige SAS in Frage zu kommen, was aufgrund seines Absorptionsspektrums auch tatsächlich bestätigt werden konnte (Abb.14). Nachdem zunächst

die Verwendung von SAS im Extraktionspuffer wegen seiner spezifischen Wirkung (siehe Abschnitt II. 1.2.) unbedingt notwendig erschien, und andererseits ein zu seiner vollständigen Entfernung aus den Praecipitaten notwendiges mehrmaliges Waschen zu einem deutlichen Verlust an isolierten Nucleinsäuren führte, wurde versucht die Verunreinigung durch SAS rechnerisch auszugleichen.

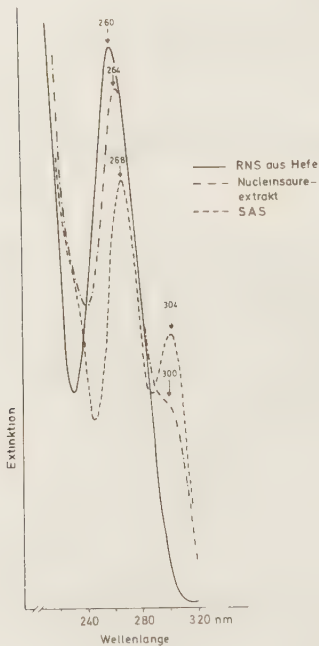


Abb.14:

UV-Absorptionsspektren von RNS aus Hefe, einem Nucleinsäureextrakt aus *Fusarium aquaeductuum* und einer 0,001 %igen Lösung von SAS in Sörensen-Puffer.

Durch geeignete Mischungsverhältnisse von RNS aus Hefe und SAS (in Abb. 15 sind die Absorptionsspektren 4 solcher Mischungen dargestellt) konnte mit Hilfe des jeweiligen OD_{260}/OD_{280} -Wertes eine Eichkurve erstellt werden (SAS: $OD_{260}/OD_{280} = 1,59$; RNS: $OD_{260}/OD_{280} = 2,15$), die eine entsprechende Korrektur der gemessenen Nucleinsäuremengen ermöglichte.

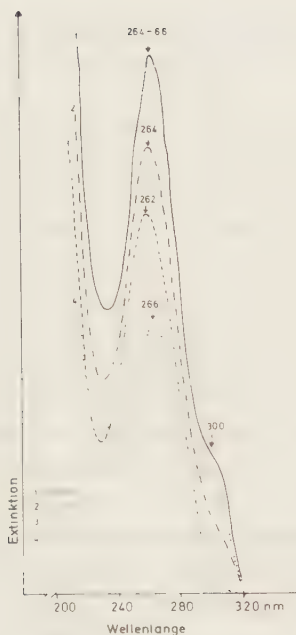


Abb.15:

UV-Absorptionsspektren von Mischungen aus reiner RNS (Hefe) und reiner SAS.

Mischungsverhältnisse:

1. 0,02 mg/ml RNS +
0,005 mg/ml SAS
($OD_{260/280} = 1,94$)
2. 0,02 mg/ml RNS +
0,0025 mg/ml SAS
($OD_{260/280} = 2,03$)
3. 0,02 mg/ml RNS +
0,0005 mg/ml SAS
($OD_{260/280} = 2,12$)
4. 0,005 mg/ml RNS +
0,005 mg/ml SAS
($OD_{260/280} = 1,71$)

Die Richtigkeit der durch die Eichkurve ermittelten Daten wurde durch eine Computeranalyse der verunreinigten Nucleinsäurespektren überprüft; dabei dienten die Meßwerte aus den UV-Spektren der reinen Substanzen RNS und SAS zur Aufstellung mehrerer linearer Gleichungssysteme. Das Mischungsverhältnis der reinen Komponenten im verunreinigten Nucleinsäureextrakt erhielt man durch Lösen der Gleichungssysteme am Computer TR 440 des Leibniz-Rechenzentrums der TU-München. Die Güte der Computeranalyse wurde an künstlich erstellten Mischungsverhältnisse bestätigt. Wie Tabelle 6 zeigt, stimmen die so erhaltenen Ergebnisse mit den Eichkurvenanalysen weitgehend überein.

mg NS (+ SAS-Anteil)	2.14	2.04	3.09	1.97	2.40	1.70	
OD _{260/280}	1.69	1.72	1.75	1.79	1.85	1.98	
% NS (nach Eichk.)	18	23	29	36	47	70	I
mg NS (nach Eichk.)	0,38	0.47	0,89	0,71	1.15	1.19	
mg NS (nach Comp.)	0.31	0.43	0.87	0.73	1.14	1.15	II

Tab.6: Korrektur der spektroskopischen Mengenbestimmung von SAS-verunreinigten Nucleinsäuren (NS).

I = Korrektur mittels des $OD_{260, 280}$ -Wertes

II = Korrektur aufgrund von Computeranalysen der verunreinigten NS-Spektren im Vergleich mit reinen SAS- und RNS-Spektren.

Da es jedoch Schrott (1973) trotz SAS im Extraktionsmedium nicht gelungen war, im Elutions- oder Radioaktivitätsprofil der Nucleinsäuren auf der MAK-Säule eine zusätzlich im Licht gebildete RNS-Spezies nachzuweisen, haben wir neben Versuchen mit SAS auch solche ohne SAS im Extraktionsmedium durchgeführt. Wir konnten dabei ohne SAS nur eine kleine Ausbeuteverminderung der ohnehin geringen DNS-Menge feststellen. Da dies für das Problem der vorliegenden Untersuchungen nicht nachteilig erschien, wurde in späteren Experimenten die Extraktion der Nucleinsäuren ohne SAS durchgeführt.

3.2. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf die Gesamtnucleinsäuren

Bei den folgenden Versuchen mußte für eine Nucleinsäureextraktion jeweils soviel Pilzmaterial verwendet werden, daß die Menge der isolierten Nucleinsäuren für die Messungen noch ausreichend war; da dafür die bisher pro Probe verwendete Mycelmenge nicht genügte und andererseits das Suspensionsvolumen wegen der hohen Kosten für die Hemmstoffe nicht zu groß werden sollte, wurde versucht, die Myceldichte bei gleicher Hemmstoffkonzentration zu erhöhen. Dabei stellte sich heraus, daß unterhalb einer bestimmten Konzentration der Inhibitoren für ihre Wirkung nicht deren Konzentration im Medium, sondern das Verhältnis von Hemmstoff- zu Mycelmenge maßgebend war. Dieser Befund wurde dazu ausgenutzt, jeweils unter vollständig oder nur teilweise hemmenden Bedingungen den Einbau von ^{14}C -Uridin in TCA-unlösliches Material und in isolierte Nucleinsäuren in der gleichen Probe zu messen.

Die in Abb. 16 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen zunächst, daß sowohl Distamycin wie auch Tubercidin ab einem Verhältnis von mg Hemmstoff/mg Myceltrockengewicht von etwa 0,33 den Einbau von Uridin in das Mycel (TCA-unlösliches Material) vollständig blockieren; eine Extraktion der Nucleinsäuren erübrigte sich bei solchen Proben, weshalb auch keine entsprechenden Werte in der Abb. 16 erscheinen. Aus dem Kurvenverlauf ist weiterhin zu entnehmen, daß bei unvollständiger Hemmung die prozentuale Inhibition des Einbaus in Mycel und isolierte Nucleinsäuren gleich ist. Außerdem zeigen die Resultate, daß - wie bereits in Abschnitt II.1.1. erwähnt - ein Verhältnis von mg Hemmstoff/mg Myceltrockengewicht von 0,085 die RNS-Synthese nur um ca. 35 % herabsetzt, obwohl bei diesem Verhältnis die Carotinoidsynthese vollkommen blockiert ist.

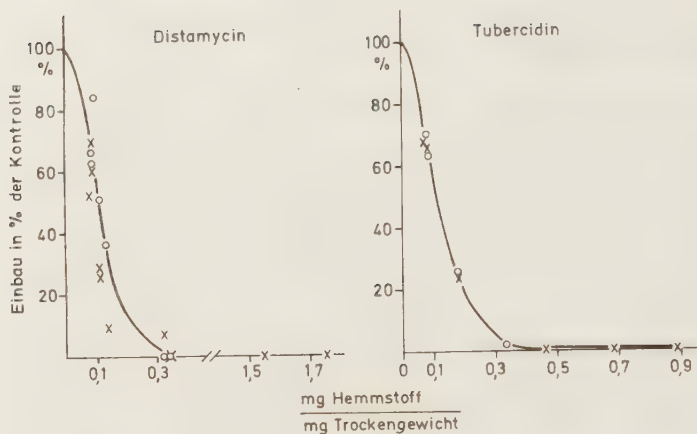


Abb.16: Abhängigkeit der Hemmung des ^{14}C -Uridineinbaus in das Mycel (TCA-unlösliches Material; x) und in isolierte Nucleinsäuren (o) vom Verhältnis: mg Hemmstoff/mg Myceltrockengewicht.

Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs des Uridineinbaus in das Pilzmycel und in die isolierten Nucleinsäuren unter dem Einfluß der beiden Hemmstoffe ist als Beispiel mit einer vollständig hemmenden Distamycinkonzentration in Abb.17 und mit einer unvollständig hemmenden Konzentration von Tubercidin in Abb.18 dargestellt. Der Leucineinbau - als Maß für die Proteinsynthese - wird dagegen bei den unvollständig hemmenden Distamycinkonzentrationen von 0,085 mg/mg Myceltrockengewicht (vollständige Blockierung der Carotinoidsynthese) nur um wenige Prozent, bei 0,19 nur um ca. 20 % beeinträchtigt.

Die vergleichenden Untersuchungen haben somit unsere im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Resultate, daß Distamycin und Tubercidin in erster Linie den Nucleinsäurestoffwechsel beeinflussen, voll bestätigt.

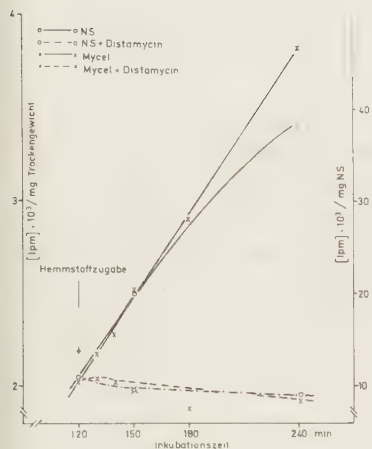


Abb. 17:

Vergleich des Verlaufs von ^{14}C -Uridineinbau in TCA-unlösliches Pilzmycel und NS-Extrakt vor und nach Zugabe von Distamycin (Endkonzentration: 0,33 mg/mg Mycel-trockengewicht).

Radioaktivität: 0,045 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ U- ^{14}C -Uridin.

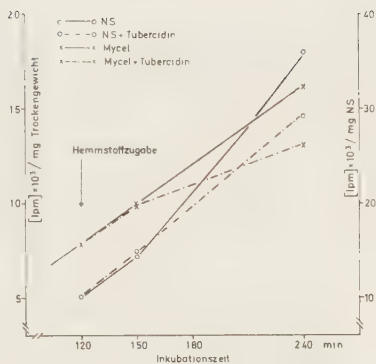


Abb. 18:

Vergleich des Verlaufs von ^{14}C -Uridineinbau in TCA-unlösliches Pilzmycel und NS-Extrakt vor und nach Zugabe von Tubercidin (Endkonzentration: 0,08 mg/mg Mycel-trockengewicht).

Radioaktivität: 0,09 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ U- ^{14}C -Uridin.

Für die Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid konnte Feulner (1969) in ähnlicher Weise nach ^{14}C -Leucininkubation eine Übereinstimmung der Aktivitätszunahme im Mycel und in den löslichen isolierten Proteinen von *Fusarium aquaeductum* zeigen und daraus schließen, daß bei einer Cycloheximidkonzentration von 10^{-4} M die Proteinsynthese vollkommen unterdrückt wird. Wir erhielten nun auch bei einer nicht vollständig hemmenden Cycloheximidkonzentration eine eindeutige Korrelation zwischen der steigenden radioaktiven Markierung von TCA-unlöslichem Pilz-

material und der Zunahme der spezifischen Radioaktivität in den löslichen Proteinen (Abb. 19).

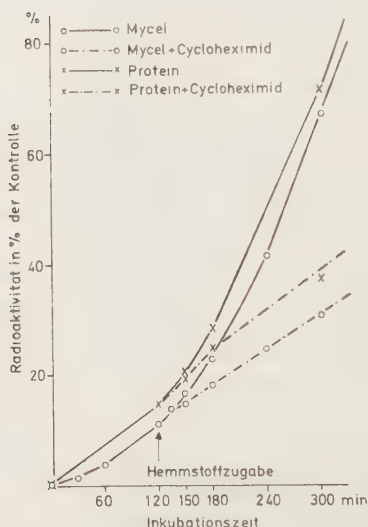


Abb.19:

Vergleich des Verlaufs von ^{14}C -Leucineinbau in TCA-unlösliches Pilzmycel und isolierte lösliche Proteine vor und nach Zugabe von Cycloheximid (Endkonzentration: 10^{-5} M).

Radioaktivität: 0,05 $\mu\text{Ci/ml}$ $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Leucin.

Inwieweit jedoch eine radioaktive Markierung der löslichen Proteine durch Umwandlung von ^{14}C -Uridin in Aminosäuren (Sakai and Kihara, 1968; Gianani et al., 1972; Dahnke, 1975) auch in *Fusarium aquaeductum* ausgelöst wird, konnte in vorläufigen Versuchen nicht geklärt werden. Wir erhielten zwar durch ^{14}C -Uridin in einzelnen Fällen eine spezifische Radioaktivität der Proteinfraction, die zwischen 8 % und 39 % der spezifischen Markierung der Nucleinsäuren lag; ob diese Radioaktivität aber nicht doch fest an die Eiweißmoleküle gebundenem ^{14}C -Uridin oder Verunreinigungen durch lösliche Nucleinsäuren zuzuschreiben ist, wurde aus zeitlichen Gründen zunächst nicht weiter überprüft. In keinem der Fälle konnte jedoch eine Korrelation zwischen Markierungskinetik von TCA-unlöslichem Pilzmaterial bzw. extrahierten Nucleinsäuren einerseits und von löslicher Proteinfraction andererseits festgestellt werden.

2.3. Die Wirkung von Distamycin und Tubercidin auf einzelne Nucleinsäurefraktionen.

Um den Beweis zu vervollständigen, daß Distamycin und Tubercidin die Nucleinsäuresynthese in *Fusarium* in vivo hemmen, wurde zusätzlich ihre Inhibitorwirksamkeit auf einzelne RNS-Arten untersucht; als Trennungsmethode erschien die Chromatographie an MAK-Säulen günstig, nachdem bereits Schrott (1973) diese Methode erfolgreich bei *Fusarium aquaeductuum* angewendet hatte.

Wir gingen dabei von der Überlegung aus, daß eine unterschiedlich starke Hemmung einzelner RNS-Fractionen nur bei Aufrechterhaltung einer reduzierten NS-Synthese erkannt werden kann und verwendeten deshalb Inhibitorkonzentrationen, die noch eine Gesamtnucleinsäureproduktion von ca. 25 % der ungehemmten Kontrolle zuließen. Die Untersuchungen wurden für beide Hemmstoffe jeweils am selben Ausgangsmaterial durchgeführt. Das Pilzmycel wurde 20 min mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert, dann erst erfolgte die Zugabe von ^{14}C -Uridin. Abb. 20 zeigt Elutions- und Radioaktivitätsprofile von Proben mit und ohne Hemmstoffe nach einer 2-stündigen Markierungsdauer.

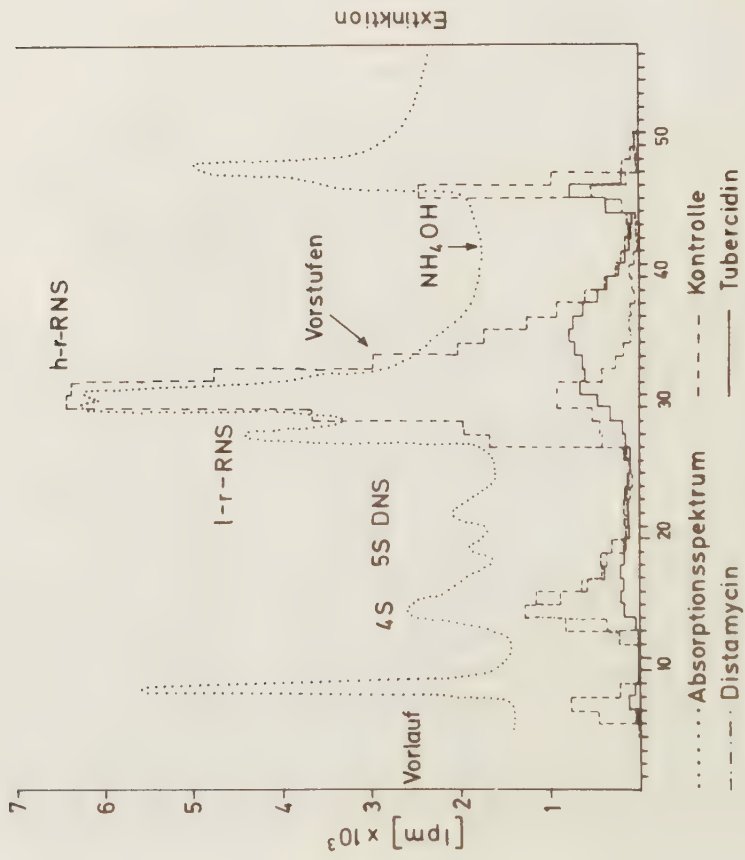
Da sich die UV-Elutionsprofile unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen nicht wesentlich voneinander unterschieden, wurde auf eine gesonderte Darstellung verzichtet. Ähnliche Ergebnisse erhielten Fouquet et al. (1975) nach Fraktionierung der Nucleinsäuren von *Physarum polycephalum* durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese; die OD₂₆₀-Profile von Cordycepin-behandelten und von Kontroll-Plasmodien zeigten ebenfalls keinen Unterschied; hingegen traten dort, wie auch in unseren Experimenten, deutliche Abweichungen in der Radioaktivitätsverteilung auf.

Abb. 20:

Vergleich der Radioaktivitätsprofile nach MAK-Chromatographie der Gesamtnucleinsäuren aus *Fusarium aquaeductum* unter Distamycin bzw. Tubercidin mit Kontrollen ohne Hemmstoff.

Die radioaktive Markierung erfolgte nach 20-minütiger Vorinkubation mit Distamycin (0,16 mg/mg TG) bzw. Tubercidin (0,18 mg/mg TG).

Markierungsdauer: 2 Std.
Radioaktivität: 0,09 $\mu\text{Ci/ml}$ $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Uridin.



Durch Distamycin und Tubercidin wird die Synthese der leichten und schweren ribosomalen RNS (entsprechend der 18S- und 25S-RNS; Lovett and Haselby, 1971; Yuyama and Zimmermann, 1972) erheblich beeinträchtigt, wobei sich allerdings ein offensichtlicher Unterschied zwischen den Wirkungen der beiden Hemmstoffe zeigt: Durch Distamycin wird die Bildung von r-RNS-Vorstufen vollkommen unterbunden, während Tubercidin eine solche Vorstufenproduktion noch zu einem gewissen Umfang zuläßt. Im Bereich der 4S- und 5S-RNS ist hingegen eine nahezu vollständige Hemmung durch Tubercidin festzustellen, während kaum eine Beeinträchtigung durch Distamycin beobachtet wurde. Aus Abb.20 wird zudem ersichtlich, daß sich unter unseren Versuchsbedingungen die radioaktive Markierung der Gesamtnucleinsäuren ausschließlich auf den RNS-Anteil beschränkt; der DNS-Anteil an den Gesamtnucleinsäuren ist somit vernachlässigbar gering.

Die an *Fusarium* erzielten Ergebnisse stehen in vollem Einklang mit Befunden über die Wirkung der beiden Hemmstoffe auf andere Organismen; eine eingehende Diskussion dieser Tatsache erfolgt am Ende der Arbeit.

III. Die Wirkung von Hemmstoffen der Transkription und Translation auf die Synthesekinetik einzelner Carotinoide und anderer lipophiler Substanzen des Terpenoidsyntheseweges.

Aufgrund von Versuchen mit dem Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid ist es sehr wahrscheinlich, daß in *Fusarium aquaeductum* Licht die Synthese von carotinoidbildenden Enzymen induziert (Diskussion siehe Rau, 1976). Da die Pigmentsynthese um so weniger gehemmt wird, je später der Inhibitor nach der Belichtung dem Organismus zugesetzt wird, werden vermutlich

bereits gebildete Enzyme in ihrer Wirkung nicht wesentlich beeinträchtigt. Hemmt man die Neusynthese der Enzyme durch Zusatz von Cycloheximid zu verschiedenen Zeiten nach der Belichtung, so kann man mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die nach Abschluß der Carotinoidbildung vorhandene Menge der einzelnen Pigmente ein relatives Maß für die zum Zeitpunkt der Hemmstoffzugabe wirksame Enzymaktivität darstellt. Bindl et al. (1970) konnten auf diese Weise indirekt zeigen, daß die einzelnen Enzyme des Biosyntheseweges, ebenso wie die entsprechenden Pigmente, in einer zeitlichen Sequenz synthetisiert werden. Aufgrund von weiteren Untersuchungen (Lang und Rau, 1972) konnte eine Substratinduktion ausgeschlossen werden, weshalb die Autoren eine gekoppelte Induktion aller Enzyme des Carotinoidbiosyntheseweges durch Belichtung annehmen. Die Ursache dafür, daß trotz einer solchen koordinierten Induktion die Enzyme und Carotinoide mit einer zeitlichen Verschiebung erscheinen, könnte möglicherweise eine sequentielle Transkription als limitierender Faktor sein.

Mit Hilfe von Distamycin und Tubercidin gelang es uns nachzuweisen, daß die Bildung der "Gesamtcarotinoide" - in zeitlicher Abhängigkeit von der Hemmstoffapplikation nach Belichtung - durch die RNS-Syntheseinhibitoren stets weniger stark beeinträchtigt wird, als dies zu entsprechenden Zeiten für Cycloheximid der Fall ist (siehe Abb.6). Diese Unterschiede können aber wohl nur dann zustande kommen, wenn ein Teil der Information bereits bei Verabreichung des RNS-Synthesehemmstoffes transkribiert und somit für den Inhibitor nicht mehr sensitiv ist, während zum selben Zeitpunkt die Translation der gleichen Information noch nicht abgelaufen ist und deshalb durch den Proteinsynthesehemmstoff noch blockiert werden kann.

Da die Enzyme des Carotinoidbiosyntheseweges in *Fusarium* noch nicht identifiziert sind, könnte möglicherweise ein Hinweis auf eine sequentielle Transkription der Information für die Synthese der lichtinduzierten Enzyme nur über die Menge der einzelnen Carotinoide unter den oben genannten Bedingungen erbracht werden. Wir gingen dabei von einer ähnlichen Überlegung aus wie Bindl et al. (1970) bei der Anwendung von Cycloheximid: Distamycin unterbindet offenbar nach kurzer Zeit die für die Carotinoidsynthese notwendige RNS-Synthese in *Fusarium*; vom Zeitpunkt der vollen Wirkung des Inhibitors an können nur die bis dahin transkribierten Informationen für die lichtinduzierten Enzyme translatiert werden und diese Enzyme dann Substrat umsetzen. Läßt man dem Pilz nach Zugabe von Distamycin nun die Zeit, die zur Bildung eines Großteils der Carotinoide notwendig ist (8 Stunden), dann ist unter der Voraussetzung, daß alle Enzyme etwa die gleiche Lebensdauer haben, die Menge eines Pigmentes ein relatives Maß für die Konzentration bzw. die Aktivität des zu seiner Synthese führenden Enzyms zum Zeitpunkt der Wirkung des Hemmstoffes.

Für die Versuche wurde also Distamycin zu verschiedenen Zeiten nach Belichtung zugegeben und nach abgeschlossener Carotinoidsynthese die Mengen der einzelnen Farbstoffe gemessen. Da diese jedoch wegen der erforderlichen Versuchsbedingungen oft unterhalb der spektralphotometrischen Identifikationsgrenze lagen, mußte zunächst eine geeignete Nachweismethode für die Änderung der Pigmentzusammensetzung bei zeitverschobener Hemmstoffapplikation ausgearbeitet werden. Am zweckmäßigsten erschien die Markierung der Carotinoide durch Inkubation des Mycels mit radioaktiven Vorstufen. Wegen der hydrophoben Natur der Pigmente wird dabei meist auf radioaktive Substrate zurückgegriffen, die sehr frühe Vorläufer nicht nur von Carotinoiden, sondern auch

von Sterolen und anderen Stoffwechselprodukten sind (Davies, 1975). Dies hat aber den großen Nachteil, daß der Einbau in einzelne Pigmente niedrig ist und starke Verunreinigungen durch andere radioaktive Produkte auftreten können, die ähnliches chromatographisches Verhalten wie die Farbstoffe zeigen. Trotz dieser Nachteile wird heute markierte Mevalonsäure allgemein als Vorstufe für solche Untersuchungen verwendet.

1. Methoden

1.1. Verseifen des R,S-(2-¹⁴C)-Mevalonsäurelactons

Die radioaktiv markierte Mevalonsäure wurde nach Britton and Goodwin (1971) durch Verseifen aus ihrem Lacton folgendermaßen freigesetzt: Das in Benzol gelöste R,S-(2-¹⁴C)-Mevalonsäurelacton (mit einer spezifischen Aktivität von 135 µCi/mg) wurde pro 1 mg mit 0,77 ml einer 0,01 M KOH-Lösung versetzt. In einem Wasserbad von 50°C konnte unter einem leichten Stickstoffstrom das Benzol ausgetrieben und damit das entstandene R,S-MVA-Isomergemisch in die wäßrige Phase gebracht werden. Die gewünschte Radioaktivität pro ml erhielt man durch weiteres Verdünnen mit dest. Wasser.

1.2. Versuchsansatz für die radioaktive Markierung der Carotinoide

Für den Versuch kamen 5 ml der Pilzsuspension in dest. Wasser in kleine Gaswaschflaschen (Volumen: 18 ml) zusammen mit je 4,5 ml PG-Lösung bzw. reiner Pufferlösung; mit 0,5 ml R,S-(2-¹⁴C)-MVA, entsprechend 25 µCi, wurde die Suspension auf 10 ml aufgefüllt (Endkonzentration von KH_2PO_4 : 1/60 M, von Glukose: 0,05 M). Die Gaswaschflaschen wurden während der ganzen Versuchszeit (4 Stunden Vorinkubation mit radioaktiver MVA, 10 min Lichtinduktion, 8 Stunden Nachreaktionszeit)

gleichmäßig mit Sauerstoff bzw. Luft durchströmt. Zu entsprechenden Zeiten wurden einzelne Proben mit den Hemmstoffen Distamycin (Endkonzentration 3×10^{-4} M) bzw. Cycloheximid (Endkonzentration 10^{-4} M) versetzt.

1.3. Extraktion, Auftrennung und Identifizierung der Carotinoide und Sterine

1.3.1. Gewinnung des radioaktiv markierten Gesamtextraktes

Die Extraktion des radioaktiv markierten Gesamtextraktes erfolgte wie im Kapitel "Material und allgemeine Methodik" dargestellt; darüber hinaus wurden jedoch von Aliquoten aus abfiltrierter Versuchslösung und Waschwasser die radioaktiven Impulsraten im Szintillationszähler ermittelt, um zu prüfen, ob über den gesamten Versuchszeitraum eine ausreichende Versorgung mit radioaktiver MVA gewährleistet war.

1.3.2. Auftrennung des Gesamtextraktes durch Phasenverteilung

Der in Petroläther (Kp. 30-50°C) übergetriebene Gesamtextrakt wurde im Scheidetrichter mit der gleichen Menge 90 %igem Methanol und einigen Tropfen einer 1n KOH versetzt und kräftig geschüttelt. Nach Phasentrennung wurde die petrolätherhaltige Epiphase mehrmals mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, an einem Vakuumsrotationsverdampfer vollständig eingeeengt und rasch in einer bestimmten Menge Petroläther wieder aufgenommen. Zur weiteren Verarbeitung mußten die in der methanolischen Hypophase enthaltenen Substanzen ebenfalls wieder in Petroläther übergeführt werden. Dies geschah durch Versetzen mit Benzol, 10 %iger Ammoniumsulfatlösung und wenig Eisessig. Die Benzolphase wurde einige Male mit Wasser gewaschen, unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingedampft und ebenfalls in einem bestimmten Volumen Petroläther wieder aufgenommen.

1.3.3. Verseifen der Epi- und Hypophase

Dazu wurden Epi- und Hypophasen jeweils bis auf 2 ml eingeengt, mit 30 ml absolutem Äthanol und 3 ml 60 %iger KOH versetzt und unter Stickstoff über Nacht im Dunkeln belassen. Die verseiften Epi- und Hypophasen schüttelte man anschließend vorsichtig mit 3 Volumenteilen Wasser, 1,5 Volumenteilen Diäthyläther und einigen ml Aceton. Die obere Phase wurde dann mehrmals mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingedampft und in einer bestimmten Menge Petroläther wieder gelöst.

Um einerseits eine Zerstörung der radioaktiv markierten Farbstoffe durch Sauerstoff und Licht zu minimieren und sie andererseits auf den Chromatogrammen identifizieren zu können, fügten wir vor den weiteren Trennungsgängen den Petrolätherextrakten Carrierpigmente zu.

1.3.4. Säulenchromatographische Trennung der Sterine und Carotinoide

Bei der säulenchromatographischen Trennung und der quantitativen Bestimmung der epiphasischen Carotinoide mit Hilfe ihrer Absorptionsspektren erwiesen sich die großen Mengen an Mycosterinen als äußerst störend, weil deren Absorptionsmaxima in einem ähnlichen Wellenlängenbereich liegen wie die der stark gesättigten Carotinoide Phytoen und Phytofluene (Bindl et al., 1970). Durch Ausfrieren konnte zwar ein Großteil der Sterine entfernt werden, eine exakte Bestimmung der genannten Carotinoidvorstufen war aber trotzdem nicht möglich. Eine deaktivierte Aluminiumoxidsäule, Brockmann-Grad III hingegen brachte den gewünschten Erfolg. Der Durchmesser der doppelwandigen, wassergekühlten Chromatographiesäule betrug 14 mm, die Höhe 50 mm, entsprechend 5 g Aluminiumoxid. Variiert nach Mende (1976) bzw. Goad and Goodwin (1966) bestand das Entwicklungsgemisch aus je 80 ml 2 %iger und 12 %iger Lösung von Diäthyläther in Petroläther (Kp. 40-60°C)

bzw. 80 ml reinem Diäthyläther. In den einzelnen Fraktionen wurden folgende Bestandteile durch Co-Chromatographie mit authentischen Vergleichssubstanzen und durch ihre Absorptionsspektren identifiziert:

- 2 %-Fraktion: Squalen, Phytoen, gefärbte Carotinoide
- 12 %-Fraktion: Lanosterin, 4-Monomethylsterine, Ergosterin
- 100 %-Fraktion: Ergosterin.

Die Auftrennung der Substanzen in der 2 %-Ätherfraktion mittels einer weiteren Säulenchromatographie wurde nach Bindl (1968) variiert. Als Adsorbens diente eine Mischung aus Calciumhydroxid und Hyflo-Supercel im Verhältnis 5:1; die Entwicklung erfolgte nacheinander mit 100 ml Petroläther (Kp. 40-60°C), 70 ml 10 % Benzol in Petroläther und 50 ml 30 % Benzol in Petroläther. Zur Erfassung geringster Farbstoffmengen wurde eine sehr kleine, doppelwandige Chromatographiesäule ($\varnothing$ 7 mm) verwendet, die zudem noch eine Wasserkühlung während des gesamten Elutionsvorganges ermöglichte. Das Adsorptionsmaterial (ca. 3 g) wurde portionsweise in Petroläther aufgeschlemmt und unter dem Sog einer Wasserstrahlpumpe innerhalb der Säule gleichmäßig dicht verfestigt. Zur weiteren Festigung diente das Spülen der fertigen Säule (Höhe: 3,8 cm) mit Petroläther unter dem Druck einer Perpex-Pumpe; die Elution der Farbstoffe erfolgte ebenfalls unter dem Druck dieser Pumpe (100 ml/h). Ein an die Säule angeschlossener Fraktionskollektor (LKB Uvicord II) ermöglichte (in 5 ml-Fractionen) eine exakte Trennung der Pigmente β -Carotin, ξ -Carotin, γ -Carotin und Neurosporin. Zur Gewinnung von Lycopin, Torulin und 3,4-Dehydrolycopin wurden das kompakte Adsorbens aus der Säule herausgedrückt, die Farbstoffbanden auseinandergeschnitten und mit einem Aceton/Methanol-Gemisch eluiert. Da eine klare Trennung von Lycopin und Torulin jedoch meist nur durch Rechromatographie erreicht werden konnte, wurde zur Vermeidung eines zu großen Radioaktivitätsverlustes durch einen weiteren Reinigungsschritt die Menge beider Farbstoffe gemeinsam bestimmt.

Nach Überführung aller Farbstoffe in Petroläther geschah ihre Identifizierung durch Aufnahme der Absorptionsspektren im Photometer der Fa. Beckmann (Modell 24), sowie durch Ausmessen der Absorptionsmaxima im Spektralphotometer der Fa. Zeiss (PQM II). Zudem wurden β -Carotin und 3,4-Dehydrolycopin durch Cochromatographie mit authentischen Vergleichssubstanzen auf Kieselgel-Dünnschichtplatte charakterisiert (Abschnitt 1.3.5.).

1.3.5. Dünnschichtchromatographie

Die Bestimmung des Phytoens in den ersten 10 Fraktionen aus der Säulenchromatographie konnte erst nach einer exakten Trennung von der Sterinvorstufe Squalen erfolgen. Dies geschah mit Hilfe eines von Mende (1976) entwickelten Dünnschichtchromatographiesystems (variiert nach Graebe, 1968). Verwendet wurden DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F-254, vor Gebrauch 45 min bei 115°C aktiviert. Das Laufmittel bestand aus einer Lösung von Benzol in Petroläther (Kp. 40-60°C) im Verhältnis 4 : 96. Mehrmaliges Einblasen eines Stickstoffstroms hielt zwar die Kammersättigung sehr niedrig und führte durch Erhöhung der R_F -Werte zu einer besseren Trennung; ein Vergleich der R_F -Werte verschiedener Proben war dadurch jedoch nicht mehr möglich. Die entwickelten Platten wurden im UV-Licht auf Fluoreszenz geprüft und anschließend Squalen und Phytoen durch Joddampf sichtbar gemacht (Abb.21).

Die Auftrennung der Sterine in der 12 %- und 100 %-Ätherfraktion, sowie die Fraktionierung der verseiften Hypophase geschah in einem nach Goad and Goodwin (1966) entwickelten System. Die Kieselgel-Dünnschichtplatten wurden in diesen Fällen in einem Laufmittel aus Essigsäureäthylester in Benzol (im Verhältnis 1 : 5) entwickelt. Dieses System ermöglichte auch eine Abtrennung des sauren Neurosporaxanthins von den hypophasischen Sterinen.

Die Identifizierung von Phytoen, Sterinen und ihren Vorstufen erfolgte nach Mende (1976) ebenfalls mit authentischen Vergleichssubstanzen.

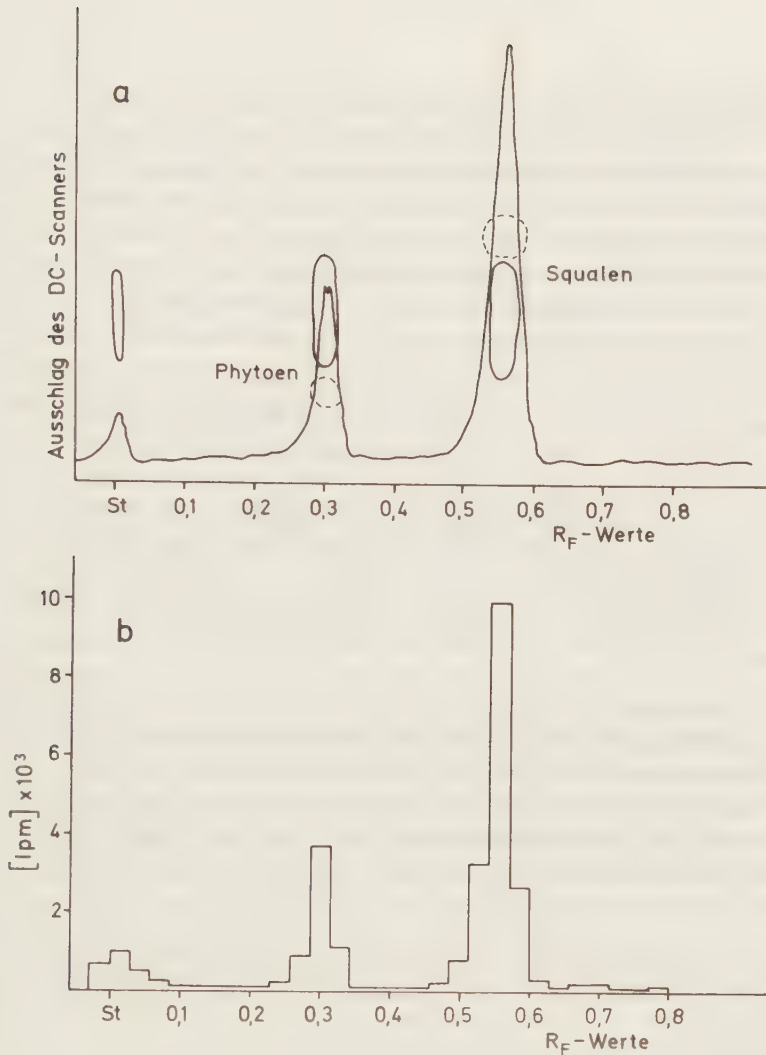


Abb.21: Dünnschichtchromatographische Trennung von Phytoen und Squalen durch eine Kieselgel-Platte; Laufmittel: Benzol/Petroläther (4:96).

- Lokalisierung der Radioaktivität durch einen Dünnschichtscanner.
- Aktivitätsverteilung, ermittelt im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer nach Abschaben des Plattenmaterials.

Die gestrichelt umrandeten Flecken bezeichnen authentische Vergleichssubstanzen.

1.4. Radioaktivitätsbestimmung der markierten Substanzen

Um die Radioaktivitätsverteilung innerhalb der lipophilen Substanzen zu verfolgen und etwaige Verluste während der einzelnen Trennungsgänge zu erfassen, wurden nach jedem Arbeitsschritt Aliquote der Substanzgemische bzw. der reinen Substanzen einer Bestimmung der radioaktiven Impulsraten im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer zugeführt.

Als Szintillatorflüssigkeiten dienten für wäßrige Medien ein Cocktail aus 1 l Dioxan, 100 g Naphthalin und 5 g PPO (Zählausbeute 89 %), für organische Lösungsmittel ein Gemisch aus 1 l Toluol und 7 g Butyl-PBD (Zählausbeute 96 %). Die einzelnen Proben wurden entweder mit ^{14}C -Toluol oder durch das Externe-Standard-Kanal-Verhältnis standardisiert. Gemessen wurden 0,5 - 1 ml Lösung in 10 ml Szintillatorflüssigkeit.

Die Lokalisierung der Radioaktivität auf den Dünnschichtplatten geschah zunächst durch den Dünnschichtscanner II mit Autochronschreiber (Fa. Berthold und Friesseke). Nach anschließender Unterteilung in einzelne Regionen, wurden diese direkt in Zählgläschen abgeschabt und die Radioaktivität im Toluolcocktail bestimmt (variiert nach Graebe, 1968 bzw. Qureshi et al., 1974).

2. Ergebnisse

2.1. Einbau von ^{14}C -MVA in den lipophilen Extrakt

Die im Abschnitt I.4 dargestellten Ergebnisse ließen vermuten, daß auch die Bildung einzelner Carotinoide bei Applikation von Distamycin bzw. Cycloheximid durch den Nucleinsäurehemmstoff zu entsprechenden Zeitpunkten stets weniger stark beeinflußt wird als durch den Proteinsynthese-

inhibitor. Um die folgenden Versuche mit Distamycin mit den früheren Untersuchungen über die Wirkung von Cycloheximid (Bindl et al., 1970) vergleichen zu können, galt es zunächst zu überprüfen, inwieweit sich die von obigen Autoren verwendeten Versuchsbedingungen auch bei radioaktiver Markierung der Carotinoide als durchführbar erwiesen. Voraussetzung für eine optimale radioaktive Markierung der Carotinoide waren dabei eine möglichst hohe Einbaurrate in den Gesamtextrakt und eine zu jedem Zeitpunkt der Inkubation ausreichende Versorgung mit radioaktiven Vorstufen.

Wie Experimente zur Kinetik des Einbaus zeigen (Abb.22), ist bei einem Einsatz von 20-25 μCi ^{14}C -MVA/Probe (ca. 35-40 mg Trockengewicht an Mycel) die Einbaurrate in den Gesamtextrakt mindestens 12 Stunden lang nahezu konstant. Die Impulsraten von Aliquoten aus der abfiltrierten Inkubationslösung bestätigten zudem einen ausreichenden Vorrat an MVA im Außenmedium; eine zusätzliche Gabe von unmarkierter MVA führte zu einer erheblichen Reduktion der aufgenommenen Radioaktivität (Abb.22). Ebenfalls sehr stark einbauvermindernd wirkte der normalerweise verwendete Zusatz von 2 %iger Glukose zum Inkubationsmedium; so waren bei dieser Konzentration nach 24-stündiger Versuchsdauer nur 2,4 % vom eingesetzten aktiven Isomer im lipophilen Extrakt zu finden, während der entsprechende Wert ohne Glukose bei 60 % lag. Eine zusätzliche Gabe von ATP (Endkonzentration: 10^{-3} M) übte hingegen keinen Einfluß auf die Höhe der Markierung aus.

Bei der Durchführung der folgenden Experimente mußte weiterhin berücksichtigt werden, daß unter verschiedenen Versuchsbedingungen nur dann eine spezifische Änderung der Syntheseraten innerhalb der radioaktiv markierten Carotinoide festgestellt werden kann, wenn zu Beginn der Belichtung und vor Zugabe der Hemmstoffe alle notwendigen Metabolite, die auch im Dunkeln gebildet werden können, ausreichend markiert vorliegen.

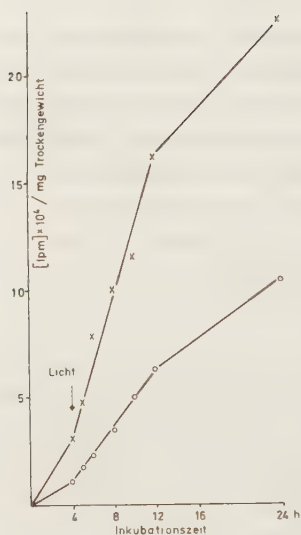


Abb.22:

Zeitlicher Verlauf des Einbaus von ^{14}C -MVA in den lipophilen Gesamtextrakt. Die Inkubationslösung enthielt keine Glukose; die 10-minütige Belichtung erfolgte nach 4-stündiger Markierungsdauer.

o = mit unmarkierter MVA
(Endkonzentration 10^{-2}M)
x = ohne unmarkierte MVA.

Diese Voraussetzung sollte durch eine 4-stündige Vorinkubation mit radioaktivem Material in völliger Dunkelheit erfüllt werden. Aus Abb. 22 ist zudem ersichtlich, daß daran anschließend der Einbau von ^{14}C -MVA in den Gesamtextrakt über mindestens 8 Stunden linear proportional der Inkubationszeit war. Innerhalb dieses Zeitraumes erreicht nach Lang (1969) auch die Synthese nahezu aller ungesättigten Carotinoide von *Fusarium aquaeductum* ihren Höchstwert. Es erschien daher gerade im Hinblick auf eine optimale radioaktive Markierung günstig, die Nachreaktionszeit der Carotinoidbildung auf 8 Stunden zu beschränken. Als Bezugspunkt diente deshalb eine belichtete Kontrolle, deren Pigmentgehalt nach dieser Zeit bestimmt wurde. Damit trotz der gegenüber den Untersuchungen von Bindl et al. (1970) geänderten Versuchsbedingungen ein exakter Vergleich der Wirkungen von Distamycin und Cycloheximid möglich war, wurde in den folgenden Experimenten parallel zu Distamycin jeweils auch Cycloheximid als Hemmstoff verwendet. Außerdem konnte zusätzlich zu den Versuchen von Bindl et al. (1970) Phytoen in die Bestimmungen einbezogen werden.

2.2. Verteilung des Einbaus von ^{14}C -MVA in die einzelnen Substanzen der nicht verseifbaren, lipophilen Fraktion.

Da von Versuch zu Versuch kein proportionaler Zusammenhang zwischen der radioaktiven Markierung des Gesamtextraktes und dem ^{14}C -MVA-Angebot/mg Trockengewicht der Proben erkennbar war und zudem innerhalb einer Versuchsreihe die Gesamtextrakte unterschiedlich starke Markierungen aufwiesen, wird zum besseren Vergleich im folgenden die Radioaktivitätsverteilung meist nicht in Impulsen/min sondern in Prozent des Einbaus in den unverseiften Gesamtextrakt bzw. in die nicht verseifbare, lipophile Epiphase angegeben. Bei Belichtungsbeginn waren durch die Vorinkubation bereits ca. 7 % vom aktiven ^{14}C -MVA-Isomer in den unverseiften Gesamtextrakt eingebaut; nach Beendigung der Inkubation lag der Wert bei 30 %. Eine Abhängigkeit von unterschiedlichen Versuchsbedingungen konnte weder bei der radioaktiven Markierung des Gesamtextraktes noch nach weiteren Reinigungsschritten bei der nicht verseifbaren lipophilen Epiphase festgestellt werden (Tab.7).

	Einbau von ^{14}C -MVA in % des aktiven Isomers	
	in den Gesamtextrakt	in die nicht verseifbare lipophile Epiphase
<u>Dunkel</u> ohne Hemmstoff	29,6	21,2
<u>Licht</u> ohne Hemmstoff	27,8	18,9
Cycloheximid	28,5	19,7
Distamycin	30,3	20,9

Tab.7: Vergleich des prozentualen Einbaus vom eingesetzten aktiven Isomer der ^{14}C -MVA in den unverseiften Gesamtextrakt und in die nicht verseifbare lipophile Epiphase bei unbelichteten und belichteten Proben mit und ohne Hemmstoffen. Zugabe der Hemmstoffe zu Beginn der Belichtung.

Dieses Ergebnis ließ bereits darauf schließen, daß trotz eines sehr hohen Einbaus von radioaktiv markierter MVA in den Gesamtextrakt nur eine verhältnismäßig geringe Markierung der einzelnen Carotinoide erwartet werden konnte, der Hauptanteil der Radioaktivität also auf die Sterine entfallen mußte.

2.2.1. Einbau von ^{14}C -MVA in die lipophilen Substanzen der Hypophase

Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Carotinoide wurde der Pigmentextrakt zunächst durch Phasenverteilung aufgetrennt. Dabei betrug die radioaktive Markierung der Hypophase zwischen 10 und 13 % vom Gesamtextrakt bei Dunkelkontrolle und belichteten Proben mit Hemmstoff, während die ungehemmte, belichtete Kontrolle eine Steigerung bis auf 20 % aufwies.

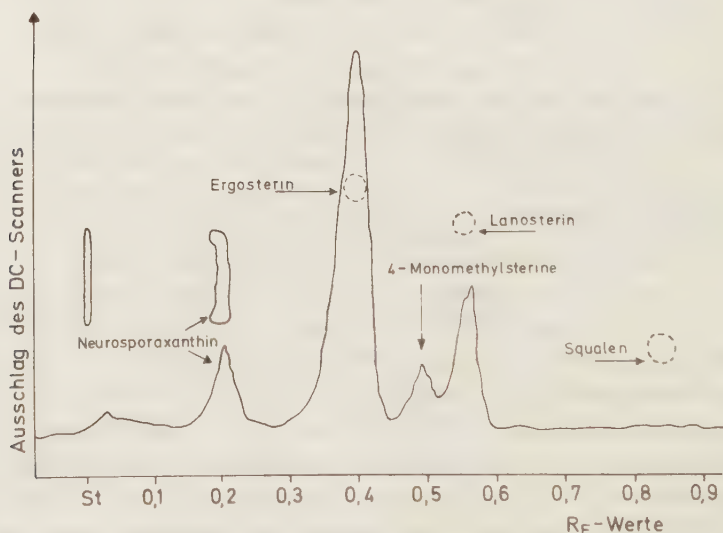


Abb.23: Radioaktivitätsverteilung nach dünnschichtchromatographischer Trennung der lipophilen, hypophasischen Substanzen (Kieselgelplatte; Laufmittel: Essigsäure-äthylester/Benzol 1:5).

Die gestrichelt umrandeten Flecken bezeichnen authentische Vergleichssubstanzen.

In der Hypophase des Farbstoffgemisches von *Fusarium* findet man nach Säulenchromatographie mit Cellulose oder Calciumcarbonat als Adsorbentien immer nur ein Pigment mit saurem Charakter; das Neurosporaxanthin. Eine gute Separation der lipophilen, hypophaischen Substanzen wird jedoch erst durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit Essigsäure-äthylester/Benzol als Laufmittel erreicht; Abb. 23 zeigt eine typische Auftrennung.

Zudem gelingt in diesem System auch eine Aufgliederung des Gesamtextraktes in saure Pigmente, neutrale Farbstoffe + Squalen und einzelne Sterinklassen (Abb.24).

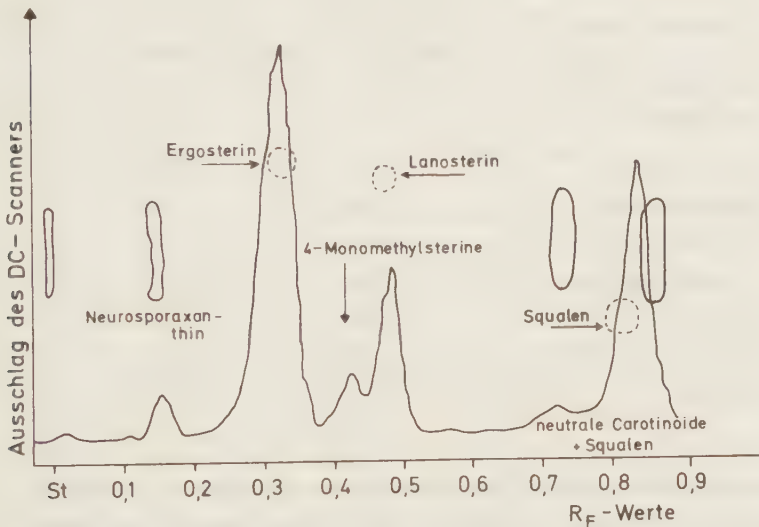


Abb.24: Radioaktivitätsverteilung nach dünn-schichtchromatographischer Trennung der lipophilen Substanzen des Gesamtextrakts (Kieselgelplatte; Laufmittel: Essigsäureäthylester/Benzol 1:5). Die gestrichelt umrandeten Flecken bezeichnen authentische Vergleichssubstanzen.

Da die Sterine für die Fragestellung dieser Arbeit keine entscheidende Bedeutung haben und sich herausstellte, daß die Markierung der hypophasischen Sterine das gleiche Muster wie das der epiphasischen Sterine zeigt, wurde auf eine quantitative Bestimmung verzichtet und aus der Hypophase nur das Neurosporaxanthin berücksichtigt. Der Prozentsatz des Einbaus in diesen sauren Farbstoff vom Einbau in die jeweiligen Gesamtextrakte bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen ist in Tabelle 8 im Vergleich zum Einbau in die neutralen Pigmente dargestellt.

Versuchsbedingungen	Anteil am Gesamtextrakt in %	
	Neurospora-xanthin	neutrale Pigmente
<u>Dunkel</u> ohne Hemmstoff	0,08	0,92
<u>Licht</u> ohne Hemmstoff	<u>4,53</u>	<u>3,92</u>
Cycloheximid (0')	0,06	0,44
Distamycin (0')	0,12	0,99
Cycloheximid (10')	0,12	0,52
Distamycin (10')	0,26	1,60
Cycloheximid (30')	0,33	2,43
Distamycin (30')	1,17	2,82

Tab.8: Prozentualer Anteil des Einbaus von ^{14}C -MVA in Neurosporaxanthin und die neutralen Pigmente am Gesamteinbau in den nicht verseiften Gesamtextrakt. Zugabe der Hemmstoffe in min nach Beginn der Belichtung.

Wie die belichtete Kontrolle ohne Hemmstoff zeigt, überwiegt mit ca. 54 % am Gesamtpigmentgehalt Neurosporaxanthin bereits nach 8-stündiger Farbstoffsynthese bei weitem alle anderen Pigmente. Dieses mit Hilfe der radioaktiven Markierung erhaltene

Ergebnis steht in vollem Einklang mit den Resultaten, die Bindl et al. (1970) durch spektralphotometrische Messungen erhielten.

Der Einfluß von Cycloheximid und Distamycin auf die licht-induzierte Bildung von Neurosporaxanthin wird im Abschnitt 2.3. gemeinsam mit den Wirkungen auf die neutralen Pigmente besprochen.

2.2.2. Einbau von ^{14}C -MVA in die lipophilen Substanzen der Epiphase

Nach Auftrennung des epiphasischen Substanzgemisches auf einer Aluminiumoxidsäule konnten die lipophilen Sterine quantitativ von den Carotinoiden und der Sterinvorstufe Squalen abgetrennt werden. Eine genauere Analyse erfolgte dann durch Dünnschicht-Co-Chromatographie mit authentischen Vergleichssubstanzen (variiert nach Mende, 1976).

Aus Tabelle 9 ist sowohl der prozentuale Anteil des Einbaus in die Gesamtsterine wie auch in die drei Hauptklassen (4,4-Dimethylsterine, 4-Monomethylsterine, 4-Desmethylsterine) am Einbau in den Gesamtextrakt bzw. in die nicht verseifbare lipophile Epiphase ersichtlich. Durch Aufarbeitungsprozesse gingen durchschnittlich nur etwa 3 % der Radioaktivität bei den jeweiligen Trennungsschritten verloren.

Von den 4,4-Dimethyl-Sterinen konnte Lanosterin, von den 4-Desmethyl-Sterinen Ergosterin in *Fusarium aquaeductum* nachgewiesen werden. Die Mengenverteilung dieser Substanzen bestätigte wiederum, daß dem Ergosterin der Hauptanteil in dem verwendeten Pilzmycel zukommt (Bindl et al., 1970; Mende, 1976). Im einzelnen läßt sich aus den in der Tab.9 zusammengefaßten Werten bezüglich der Sterine folgendes entnehmen:

	Dunkel		Licht ohne		Cyclo 0'		Dist 0'		Cyclo 10'		Dist 10'		Cyclo 30'		Dist 30'	
	% von	GE	E	% von	GE	E	% von	GE	E	% von	GE	E	% von	GE	E	% von
Einbau in den Gesamt-extrakt (Ipm $\times 10^3$)	6875			6450			6977			6542			6434			7033
	% von	GE	E	% von	GE	E	% von	GE	E	% von	GE	E	% von	GE	E	% von
nicht verseifbare lip. Epiphase	71,8				67,9			68,7			72,1			72,0		72,6
Gesamsterine	63,7	86,6	56,8	83,6	46,6	64,8	44,6	74,1	47,4	65,5	50,8	70,5	49,8	67,4	50,8	69,9
Ergosterin	46,9	65,0	43,6	64,2	33,3	45,9	35,3	51,4	35,1	48,4	36,4	50,6	37,1	50,3	37,9	52,2
4-Monomethylsterin	3,3	4,7	2,8	4,2	2,8	4,0	3,8	5,6	2,7	3,7	3,6	4,9	3,3	4,5	3,7	5,2
Lanosterin	8,9	12,6	7,6	11,3	6,9	9,7	7,7	11,2	7,3	10,1	9,3	12,8	8,6	11,6	9,9	13,7
2 %-Ätherfraktion	8,7	12,3	9,5	13,9	23,6	34,1	18,4	26,9	23,8	33,4	19,9	27,7	22,8	30,9	18,2	25,1
Squalen	6,7	9,4	4,2	6,2	22,0	31,8	16,5	24,2	20,1	30,9	17,0	23,7	19,3	26,0	14,2	19,6
Phytoen		0,95		2,03		0,49		0,99		0,49		1,47		2,00		2,05
gefärbte Carotinoide		0,31		3,75		0,15		0,47		0,23		0,76		1,31		1,85

Tab.9: Radioaktivitätsverteilung innerhalb der einzelnen lipophilen Fraktionen der Epiphasen nach Auftrennung der Gesamtextrikte durch Phasentrennung, Säulen- und Dünnschichtchromatographie. Der Anteil der markierten Substanzen ist in % des Einbaus in den entsprechenden Gesamtextrakt (GE) bzw. in dessen nicht verseifbare lipophile Epiphase (E) angegeben. (Zugabe der Hemmstoffe in min nach Beginn der Belichtung)

Der Anteil der Sterine an der nicht verseifbaren lipophilen Epiphase liegt je nach Versuchsbedingungen zwischen 65 und 85 %; rechnet man Squalen als Sterinvorstufe noch hinzu, so erhöhen sich diese Werte auf ca. 90-96 %. Die Synthese der Gesamtsterine, einschließlich ihrer Vorstufen, wird im Gegensatz zur Farbstoffbildung durch Licht nicht gefördert, sondern eher etwas herabgesetzt. Diese lichtbedingte Verminderung ist wahrscheinlich auf einen erhöhten Abzug von radioaktiven Vorstufen in den Carotinoidbiosyntheseweg zurückzuführen, denn die Abnahme des Squalengehaltes liegt größenordnungsmäßig im Bereich der durch Lichtinduktion gebildeten Carotinoidmenge (siehe auch Bindl, 1968). Dagegen hemmen Distamycin und Cycloheximid die Bildung der Sterine deutlich. Die dabei gesteigerte Squalensynthese könnte möglicherweise folgendermaßen zustande kommen: Durch Licht werden offensichtlich keine Enzyme des Sterinbiosyntheseweges induziert (Bindl et al., 1970; Mende, 1976); die entsprechenden konstitutiven Enzyme unterliegen vermutlich einem raschen Abbau. Wenn die Hemmstoffe nun die Neubildung der Enzyme verhindern, die Squalen zu 2,3 Oxisqualen und schließlich zu Ergosterin umsetzen, und zudem der Abzug von Terpenoidvorstufen für die lichtinduzierte Pigmentsynthese blockiert ist, kann der Anteil des Squalens an der lipophilen Epiphase erheblich ansteigen.

Erst die vollständige Abtrennung der Sterine von den Carotinoiden ermöglichte nun eine eindeutige Mengenbestimmung einzelner Farbstoffe. Obwohl der Anteil der Markierung in den einzelnen Pigmenten z.T. weit unter 1 % vom Gesamteinbau in die nicht verseifbare lipophile Epiphase lag, konnten hier dennoch klare Unterschiede der Impulsraten in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen festgestellt werden. Tabelle 10 veranschaulicht diesen Befund besonders deutlich in einer Gegenüberstellung der Impulsraten von belichteten und unbelichteten Proben einer Versuchsreihe nach 8-stündiger Pigmentsynthese. Die verhältnismäßig niedrigen

Werte der Fraktion "Lycopin/Torulin" kommen wahrscheinlich durch den Radioaktivitätsverlust während der weiteren Arbeitsgänge zustande, die zur Gewinnung dieses Farbstoffanteils notwendig sind (siehe "Methoden": 1.3.4). Deshalb können wir hier, wie auch bei allen weiteren Darstellungen, keine eindeutigen Aussagen bezüglich dieser Pigmente machen.

Produkte der jeweiligen Reinigungsschritte	<u>Licht</u> (Ipm)	<u>Dunkel</u> (Ipm)
nicht verseifbare lipophile Epiphas	5 277 900	5 475 100
davon: 2 %-Ätherfraktion	824 900	827 300
davon: Phytoen	130 200	45 500
β -Carotin	14 600	2 560
Neurosporin	15 760	1 720
γ -Carotin	102 870	4 970
Lycopin/Torulin	90 500	5 540
Squalen	375 460	674 750

Tab.10: Vergleich der Impulsraten im belichteten und unbelichteten Pilzmycel nach 12-stündiger Inkubation mit ^{14}C -MVA (aktives Isomer: ca. 25 250 000 Ipm).

Durch die Werte in Tab.10 wird erneut bestätigt, daß *Fusarium aquaeductum* auch im Dunkeln eine geringe Carotinoidsynthese aufweist (Bindl, 1968; Mende, 1976). Die Syntheserate von Phytoen in solchen Dunkelkulturen ist nicht auf eine spezielle Anhäufung dieser Substanz sondern vielmehr auf die allgemeine nicht lichtabhängige Carotinoidsynthese zurückzuführen. Bereits eine 10-minütige Belichtung erhöht die Phytoensynthese so

drastisch, daß auch unter Kurzzeitbelichtung die von Mende (1976) nachgewiesene Lichtregulation des stark ungesättigten Pigmentes bestätigt werden konnte.

Eine Zunahme der Squalensynthese nach Belichtung (Mende, 1976) konnte hingegen nicht festgestellt werden; vielmehr zeigte sich unter den angewendeten Versuchsbedingungen (10 min Belichtung, 8 Stunden Terpenoid-synthese), wie bereits erwähnt, eine deutliche Abnahme der Bildung dieser Sterinvorstufe.

2.3. Die Wirkung von Distamycin und Cycloheximid auf die Synthese einzelner Carotinoide

Die einzelnen Pigmente werden bei Fusarium in so unterschiedlich großen Mengen gebildet, daß ein sinnvoller Vergleich der Hemmung durch die Inhibitoren nur möglich ist, wenn die Carotinoidsynthese in Prozent einer belichteten Kontrolle ohne Hemmstoff ausgedrückt wird; die auf diese Weise berechneten Werte geben also die nach 8-stündiger Farbstoffbildung vorhandenen Carotinoide als Bruchteil der Pigmentmenge an, die das Mycel unter den gewählten Bedingungen ohne Hemmstoff maximal bildet. In Tabelle 11 bzw. Abbildung 25 und 26 sind diese Ergebnisse dargestellt.

	Carotinoidmenge in % der Kontrolle							
	Dun- kel	Licht						
		ohne	Cyclo 0'	Dist 0'	Cyclo 10'	Dist 10'	Cyclo 30'	Dist 30'
Phytoen	35	100	16	42	16	65	103	104
ζ-Carotin	13	100	1	27	26	42	61	85
Neurosporin	11	100	1	14	1	27	59	77
γ-Carotin	5	100	0	7	1	24	43	75
Tor./Lyc.	7	100	0	5	2	9	29	38
Neurospora- xanthin	1	100	0	4	1	6	5	24

Tab.11: Carotinoidsynthese bei Zugabe der Hemmstoffe Cycloheximid und Distamycin zu verschiedenen Zeiten (min) nach Belichtungsbeginn in % einer Kontrolle ohne Hemmstoff. - Belichtungsdauer: 10 min.

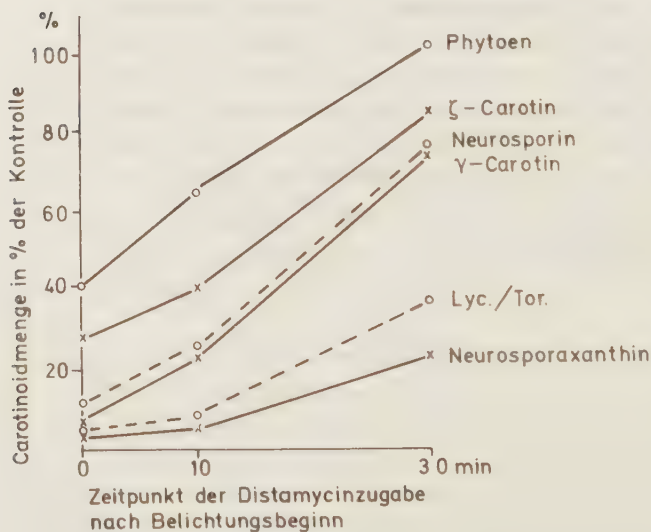


Abb.25: Gehalt des Mycels an einzelnen Carotinoiden nach 8-stündiger Farbstoffbildung bei Zugabe von Distamycin zu verschiedenen Zeiten nach Belichtungsbeginn. Belichtungsdauer: 10 min.

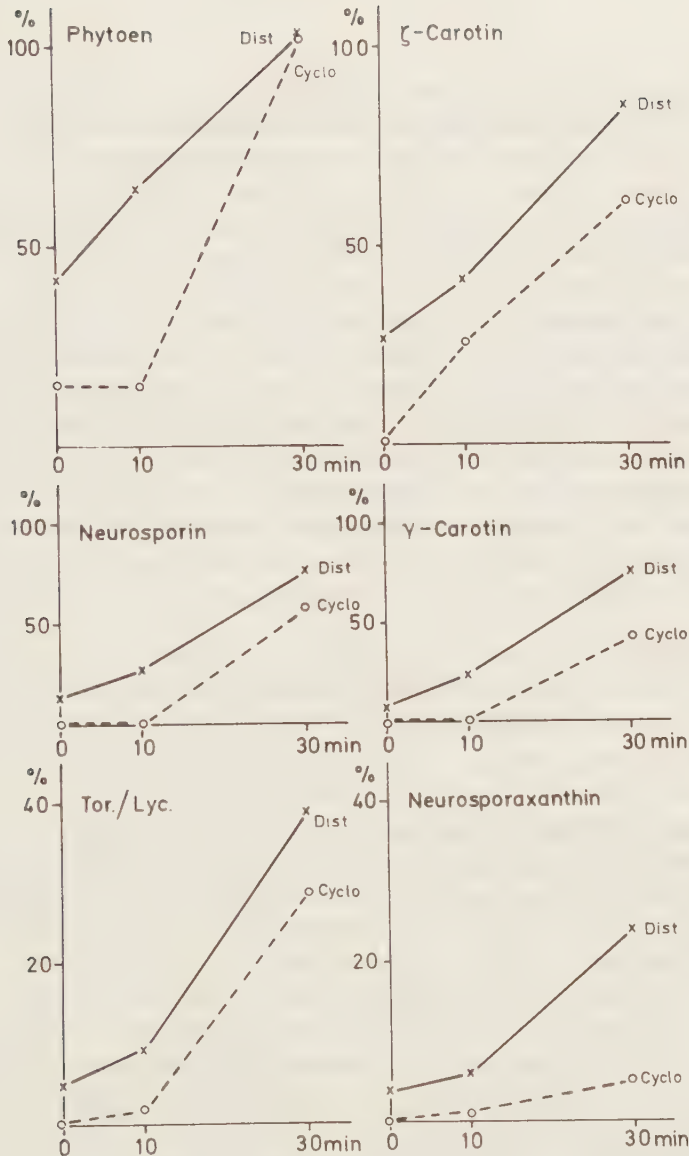


Abb.26: Vergleich der Hemmung der Synthese der einzelnen Carotinoide durch Cycloheximid und Distamycin bei Zugabe zu verschiedenen Zeiten nach Belichtungsbeginn. Ordinaten: Pigmentmenge in % der Kontrolle; Abszissen: Zeitpunkt der Hemmstoffapplikation.

Die Werte zeigen eindeutig, daß Distamycin die Synthese auch jedes einzelnen Carotinoids umso weniger hemmt, je später der Inhibitor nach Belichtungsbeginn appliziert wird; der Grad der Hemmung ist aber zu jedem Zeitpunkt umso stärker, je weiter "hinten" das jeweilige Pigment im Biosyntheseweg liegt (Abb.25; Tab.11, senkrechte Spalten). Der letztere Befund kann als Hinweis auf eine lichtinduzierte sequentielle Transkription der Information für die Synthese carotinoidbildender Enzyme gelten. Ein Vergleich der Hemmung durch Distamycin mit derjenigen durch Cycloheximid läßt darüberhinaus erkennen, daß der Proteinsynthesehemmstoff bei jeder Applikationszeit die Bildung der entsprechenden, einzelnen Carotinoide stärker beeinträchtigt als der Transkriptionshemmstoff (Abb.26; Tab.11, waagrechte Reihen). Dies kann als erneute Bestätigung der spezifischen Wirkung der beiden Hemmstoffe gewertet werden.

Einer zusätzlichen Erklärung bedürfen die im Vergleich zu den im Abschnitt I dargestellten Ergebnissen verhältnismäßig hohen Carotinoidmengen bei der Probe "Dist 0": Distamycin, zum Zeitpunkt des Belichtungsbeginns zugegeben, benötigt eine bestimmte Zeit, um in der Zelle wirksam zu werden und die eventuell lichtinduzierte Neusynthese von Nucleinsäuren zu unterbinden. Bis dahin kann die Information für die Synthese der im Biosyntheseweg weiter "vorne" liegenden Pigmente Phytoen, β -Carotin und Neurosporin bis zu einem gewissen Umfang noch transkribiert werden. Da die hierdurch gebildeten Farbstoffe jedoch bei der spektralphotometrischen Messung des Gesamtextraktes (siehe Abschnitt "Material und allgemeine Methodik") nicht erfaßt werden und darüberhinaus ihr Anteil am "Gesamtfarbstoff" ziemlich gering ist, steht das in Abschnitt I.2.2. dargestellte Ergebnis einer nahezu vollkommenen Hemmung der Carotinoidsynthese bei Hemmstoffzugabe zu Belichtungsbeginn nicht im Widerspruch zu den in Tabelle 11 angeführten Resultaten. Entsprechendes gilt auch für die Resultate mit Cycloheximid.

2.4. Identifizierung weiterer Carotinoide im Mycel von Fusarium aquaeductum

Die Verwendung von Carrierpigmenten zum Schutz von radioaktiv markierten Carotinoiden während der verschiedenen Trennungsgänge führte zum qualitativen Nachweis von β -Carotin und 3,4-Dehydrolycopin im Wildstamm von *Fusarium aquaeductum*. Der Grund dafür, daß diese Farbstoffe bisher nicht gefunden worden waren, könnte darauf zurückzuführen sein, daß das Pilzmycel länger als in früheren Versuchen (nämlich 2-3 Stunden) belichtet wurde, um für eine eindeutige Bestimmung aller nach Lichtinduktion gebildeten Carotinoide ausreichende Mengen an einzelnen Farbstoffen zu erhalten (logarithmische Abhängigkeit der Pigmentmenge von der eingestrahltten Lichtmenge: Rau, 1967a).

Die chromatographische Auftrennung eines derart gewonnenen Farbstoffgemisches auf einer Calciumhydroxid-Hyflo-Supercelsäule zeigte dabei folgendes Ergebnis (Abb. 27) :

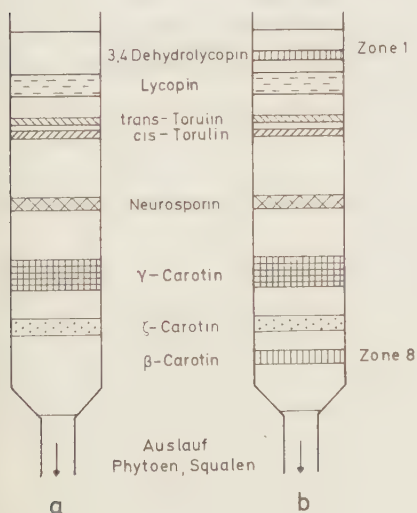


Abb.27:
Verteilung der Carotinoide von *Fusarium aquaeductum* auf einer Ca(OH)_2 -Hyflo-Supercelsäule.

Entwicklergemisch: Petroläther/Benzol.

Belichtungsdauer:

a) 10 min

b) 2-3 Stunden

Die eingezeichneten Mengen entsprechen nicht den tatsächlichen Verhältnissen.

Neben den bereits bekannten Pigmentbanden traten zusätzlich zwei weitere, gefärbte Zonen auf, und zwar eine gelb-orange vor dem β -Carotin und eine blauviolette nach dem Lycopin.

Nach Isolierung dieser Farbstoffe erfolgte ihre Identifizierung anhand ihrer Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich. Die Spektren wurden in verschiedenen Lösungsmitteln (Petroläther: Kp. 40-60°C, n-Hexan, Benzol) mit einem selbstregistrierenden Beckmann-Spektralphotometer (Modell 24) aufgenommen; anschließend wurde die Lage der Absorptionsmaxima mit einem Zeiss-Spektralphotometer (PMQ II) genau bestimmt. Durch Vergleich mit Literaturwerten sowie durch Co-Chromatographie mit entsprechenden authentischen Farbstoffen auf Kieselgeldünnschichtplatten konnten Zone 8 (Abb. 27b) als β -Carotin und Zone 1 (Abb. 27b) als 3,4-Dehydrolycopin identifiziert werden (Jensen, 1965; Harding et al., 1969; Mitzka, 1973).

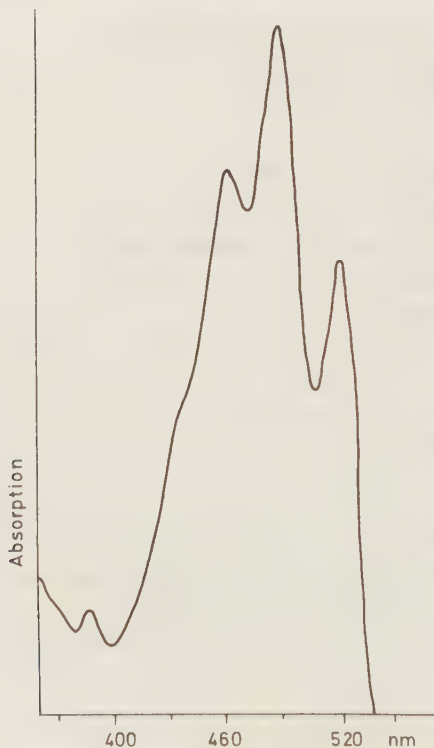


Abb.28:
Absorptionsspektrum von
3,4-Dehydrolycopin in
n-Hexan nach mehrmaliger
Re-Chromatographie auf
einer Ca(OH)_2 -Hyflo-Super-
celsäule.

Abbildung 28 zeigt das Absorptionsspektrum von 3,4-Dehydrolycopin in n-Hexan; das Vorhandensein eines ausgeprägten Absorptionsgipfels bei ca. 385 nm läßt vermuten, daß es sich wenigstens z.T. um ein cis-Isomeres handelt.

Neben dem Phytoen (Mende, 1976) und dem Torulin (Bindl, 1966) wäre dies ein weiterer Farbstoff, der in *Fusarium* in cis-Form vorliegt. Allerdings kann auch bei 3,4-Dehydrolycopin, ebenso wenig wie bei Torulin, entschieden werden, ob das cis-Isomere erst durch den Aufarbeitungsprozeß entsteht. Die in *Fusarium* durch Lichtinduktion hervorgerufene Bildung von 3,4-Dehydrolycopin und β -Carotin kann als zusätzlicher Beweis für die Richtigkeit der von Davies (1975) aufgestellten möglichen Carotinoidbiosynthesewege in Pilzen gelten.

Der Zusammenhang zwischen der Belichtungsdauer und der dadurch induzierten Synthese von 3,4-Dehydrolycopin bzw. β -Carotin bedarf noch einer genauen Klärung. Abbildung 27 zeigt aber ganz deutlich, daß diese Farbstoffe bei der Bestimmung der radioaktiv markierten Carotinoide nach 10-minütiger Lichtinduktion unbeachtet bleiben konnten.

Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Untersuchungen über den speziellen Fall der lichtabhängigen Carotinoidsynthese bei *Fusarium* einen Beitrag zur Lösung der viel allgemeineren Frage zu leisten, über welche Mechanismen die Photoregulation der pflanzlichen Entwicklung und der daran beteiligten Synthesen läuft. Die von Mohr (1966, 1972) aufgestellte Hypothese einer differentiellen Genaktivierung als Regulationsprinzip bei Phytochrom-gesteuerten Prozessen in pflanzlichen Organismen beinhaltet die Vorstellung, daß P_{fr} die Aktivierung oder Reprimierung bestimmter "potentiell aktiver" bzw. "reprimierbarer" Gene bewirke, wodurch über eine differentielle m-RNS-Synthese die Neusynthese von Enzymen geregelt werden kann. Für die Manifestierung von Gen-kontrollierten Antworten in höheren Pflanzen würde man aber Stunden erwarten und nicht so kurze Zeiten, wie sie bei zahlreichen Phytochromreaktionen auftreten (z.B. Haupt, 1959; Fondeville et al., 1966; Oelze-Karow et al., 1970; Drumm et al., 1972). Derartige Vorgänge sprechen daher eher für eine direkte Beeinflussung der Translation ohne vorherige Umsteuerung der Genaktivierung oder sogar "nur" für eine Aktivierung bzw. Inaktivierung der fertigen Enzyme (Zusammenfassung und Diskussion siehe Schopfer, 1973; Smith, 1974). Gerade aufgrund solcher "schnellen" Reaktion wird, neben einigen anderen Befunden, heute als Primärreaktion der Phytochromwirkung eine lichtbedingte Änderung von Membraneigenschaften (Permeabilität, Membranpotentiale) diskutiert (Ergebnisse und Hypothesen siehe Smith, 1974). Da Jaffe (1970) aus seinen Versuchen mit Mung-Bohnen den Schluß zog, daß die permeabilitäts-ändernde Substanz Acetylcholin als lokales Hormon an den Phytochrom-vermittelten Phänomenen beteiligt ist, und es

zudem Gressel et al. (1971) gelungen war, auch bei einer Blaulichtinduzierten Reaktion - der Sporenbildung beim Pilz *Trichoderma viride* - durch Acetylcholin den Lichteffekt zu simulieren, lag es nahe, eine ähnliche Wirkung bei der Photoinduktion der Carotinoidsynthese von *Fusarium aquaeductuum* zu überprüfen.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen nun in keiner Weise die obigen Resultate. Obwohl wir durch unsere Versuchsanordnung eine vorzeitige Destruktion von Acetylcholin wahrscheinlich ausgleichen konnten, erreichten wir in keinem Fall - weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen - eine Induktion der Farbstoffbildung. Ähnlich erfolglos blieben Kasemir und Mohr (1972) im Fall von Phytochrom-gesteuerten Prozessen bei *Sinapis*; sowohl Acetylcholin als auch Caramylcholinchlorid (ebenfalls eine permeabilitätsändernde Substanz) zeigten nicht den geringsten photomimetischen Effekt auf die Anthocyan-synthese oder das Hypokotylwachstum, woraus diese Autoren folgerten, daß P_{fr} in verschiedenen Systemen unterschiedlich zu wirken scheint, auch im Hinblick auf die "Primärreaktion".

Diese eindeutig negativen Resultate und einige Hinweise auf eine lichtinduzierte Neubildung von RNS in *Fusarium* (Schrott, 1973) gaben nun Anlaß dazu, die Beteiligung einer differentiellen Genaktivierung bei der photoinduzierten Carotinoidsynthese zu überprüfen. Um der Lösung des Problems von einer anderen Seite her näherkommen zu können, sollte durch den Einsatz entsprechender Hemmstoffe indirekt der Ablauf von Transkriptionsprozessen nachgewiesen werden.

Durch die verwendeten Hemmstoffe der RNS-Synthese Distamycin und Tubercidin konnte eine nahezu vollständige Hemmung der Carotinoidsynthese ohne wesentliche Beeinträchtigung der

übrigen Stoffwechselvorgänge erzielt werden. Ein Vergleich der Wirkung von Distamycin und Tubercidin mit derjenigen des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid bezüglich der Abhängigkeit der Reaktion vom Zeitpunkt der Hemmstoffzugabe verdeutlicht gerade in den ersten 30 min nach Belichtungsbeginn (Abb.6), daß vor einer vermuteten, lichtinduzierten de-novo-Synthese von carotinoidbildenden Enzymen auch schon die Bildung einer spezifischen RNS photoreguliert sein muß. Zudem kann man aus Abbildung 6 und den Ergebnissen, die mit dem Reduktionsmittel Dithionit (Theimer und Rau, 1970) erzielt worden waren, ein weiteres Kriterium für die Spezifität der Distamycin- und Tubercidinwirkung ableiten: Während Dithionit ca. 15 min nach Abschalten des Lichtes die mutmaßlichen Photooxidationsvorgänge und damit auch die Induktion nicht mehr beeinflussen kann, sind die RNS-Synthesehemstoffe bei Zugabe zu diesem Zeitpunkt immerhin noch in der Lage, die Carotinoidsynthese zu 84 % zu blockieren; für Cycloheximid liegt der entsprechende Wert bei 96 %. Die Dauer der angenommenen Neusynthese von Nucleinsäuren läßt sich auf diesem indirekten Wege also auf eine relativ kurze Zeit zwischen Photoinduktion und Enzymsynthese beschränken. Damit wurde im Gegensatz zu früheren Untersuchungen über andere lichtinduzierte Synthesen (z.B. Phytochrom-gesteuerte Anthocyansynthese: Mohr und Senf, 1966; Mohr und Bienger, 1967) erstmals mit entsprechenden Hemmstoffen eine eindeutige zeitliche Sequenz von "Primärreaktion", Transkription und Translation gezeigt.

Obwohl nach Untersuchungen von Bindl et al. (1970) eine Cycloheximidzugabe zu einer Zeit, wo die Pigmentbildung in voller Stärke eingesetzt hat (ca. 5 Stunden nach Belichtungsbeginn), kaum eine Verminderung der Farbstoffbildung bewirkt, wird bei einer entsprechenden Applikation der Transkriptionshemmstoffe noch nicht der Wert der unge-

hemmten Kontrolle erreicht. Als Ursache dafür könnte man annehmen, daß durch die angewendete Inhibitorkonzentration die partielle Hemmung der Nucleinsäuresynthese die übrigen Stoffwechselvorgänge doch soweit beeinträchtigt, daß sich dies auch zum Teil auf die Bildung der Pigmente selbst erstreckt. Da auch eine "Entgiftung" der Transkriptionshemmstoffe nicht wahrgenommen werden konnte, ist anzunehmen, daß der Pilzmetabolismus offensichtlich während der Nachinkubationszeit durch Cycloheximid weniger geschädigt wird als durch die RNS-Inhibitoren.

Nachdem durch die Zeitabhängigkeit der Wirkung der applizierten Hemmstoffe erste Hinweise auf eine Beteiligung des Nucleinsäuresystems bei der Farbstoffbildung in *Fusarium* erzielt wurden, mußte klargestellt werden, ob Distamycin und Tubercidin tatsächlich primär die RNS-Synthese beeinflussen. Aufschluß darüber erhielten wir zunächst durch die unterschiedliche Reaktion der Inhibitoren auf den Einbau von radioaktiv markiertem Uridin bzw. Leucin in TCA-unlösliches Pilzmaterial; es zeigte sich dabei nämlich eine zeitliche Verschiebung in der Hemmung und zwar besonders auffällig in "Doppelmarkierungsversuchen", bei denen das Mycel gleichzeitig mit ^{14}C -Uridin und ^3H -Leucin inkubiert wurde: Abb. 10 und 11 veranschaulichen, daß gerade unter identischen Inkubationsbedingungen der Einbau von ^{14}C -Uridin in das säurefällbare Pilzmaterial durch Distamycin und Tubercidin spätestens 10 min nach Hemmstoffapplikation blockiert wird, während sich eine ebenso starke Hemmung des Leucineinbaus erst im Verlaufe von 30 min allmählich einstellt. In ähnlichen Untersuchungen bei anderen Organismen

konnte durch Extraktion der Nucleinsäuren und Proteine (Francki et al., 1971; Ferrari and Widholm, 1973; Tønnesen and Friesen, 1973) überzeugend nachgewiesen werden, daß eine Zunahme der Radioaktivität in TCA-unlöslichem Material durch Einbau von markierten Vorstufen als Maß für die Synthese der entsprechenden Makromoleküle gelten kann; wir ziehen daher aus den bisherigen Ergebnissen den Schluß, daß Distamycin und Tubercidin höchstwahrscheinlich primär die Nucleinsäuresynthese blockieren und daß erst als Folge davon eine Hemmung der Proteinsynthese eintritt. Annähernd gleiche Resultate erhielten Mc Cullough and John (1972) für die Hemmung der RNS-Synthese in *Chlorella* durch das Adenosinanalogen 6-Methyl-Purin. Unsere Annahme wird zudem noch dadurch unterstützt, daß der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid einen gegenteiligen Effekt auf den Uridin- bzw. Leucineinbau zeigt (Abb. 13). Diese Beobachtung steht im Einklang mit jenen von Key (1966) und Ingle (1968), daß Cycloheximid - im Gegensatz zu Experimenten mit tierischen Zellen - in pflanzlichen Geweben den Einbau von radioaktiven Vorstufen in Nucleinsäuren nach einiger Zeit ebenso stark blockiert wie in Proteine; Ursache dafür könnte bereits ein Mangel an nucleinsäuresynthetisierenden Enzymen zu diesem Zeitpunkt sein.

Unsere Vermutung, daß Distamycin und Tubercidin bei der Hemmung der Carotinoidsynthese in *Fusarium* primär die Nucleinsäurebildung beeinflussen, wird aber eindeutig dadurch bestätigt, daß die selektive Wirkung der Inhibitoren an extrahierten Nucleinsäuren und Proteinen direkt nachgewiesen werden konnte. Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs des Uridineinbaus in das Pilzmycel und in die isolierten Nucleinsäuren zeigte unter dem Einfluß der beiden Hemmstoffe eine überraschend genaue Übereinstimmung der prozentualen Hemmung (Abb. 17, 18), während sich eine gelegentliche

Markierung der Proteinfraction als unspezifisch erwies. Im Gegensatz zu Untersuchungen an *Rhodotorula* (Gianani, 1972) und Rattenleber (Sakai et al., 1968; Dahnke, 1975) besteht damit für *Fusarium* kein Zweifel an der Eignung von ^{14}C -Uridin als Vorstufe zur Markierung von Nucleinsäuren. Für die Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid konnten wir bei nicht vollständig blockierenden Hemmstoffkonzentrationen ebenfalls eine eindeutige Korrelation zwischen der steigenden radioaktiven Markierung von TCA-unlöslichem Pilzmaterial und der Zunahme der spezifischen Radioaktivität in löslichen Proteinen durch Einbau von ^{14}C -Leucin belegen; entsprechende Resultate hatte Fulner (1969) bereits mit einer vollständig hemmenden Cycloheximidkonzentration erreicht.

Komplettiert wird der Nachweis der Spezifität der verwendeten RNS-Inhibitoren schließlich durch die Kontrolle ihrer Wirksamkeit auf einzelne RNS-Arten bei noch zum Teil funktionierender Nucleinsäuresynthese. Die unter diesen Bedingungen vollständige Hemmung der r-RNS-Vorstufen durch Distamycin legt die Vermutung nahe, daß der Inhibitor auch in *Fusarium aquaeductuum* vornehmlich die Bildung neuer RNS hemmt, während eine bereits laufende Synthese nur wenig beeinflußt wird. Möglicherweise verhindert Distamycin hier ebenso bevorzugt die Bindung der RNS-Polymerase an bestimmte Abschnitte der DNS, wie dies für die Promoter-Regionen von T4-DNS bereits gezeigt werden konnte (Lit.-Übers.: Puschendorf et al., 1974).

Durch Tubercidin wird hingegen nicht primär eine RNS-Neusynthese verhindert; der hemmende Effekt beruht vielmehr darauf, daß durch den Einbau des Adenosinanalogen in wachsende Ketten funktionsuntüchtige RNS-Arten entstehen, als deren Folge dann die weitere Synthese stark reduziert wird oder ganz zum Stillstand kommt (Acs et al., 1964).

Die ausgeprägte Hemmung der 18S- und 25S-RNS bei einer minimalen Inhibition der ribosomalen Vorstufen in *Fusarium aquaeductuum* steht dabei in vollem Einklang mit den Ergebnissen von Weiss (1974) an Novikoff-hepatoma-Zellen. In diesen Untersuchungen konnte unter Tubercidin eine starke Hemmung der 18S- und 25S-RNS beobachtet werden, während 38S- und 32S-RNS-Vorstufen weit weniger beeinträchtigt wurden; Synthese und Processing der ersten Vorstufe, der 45S-RNS also, wurde in Gegenwart des Adenosinanalogen jedoch fortgesetzt. Der Einbau von Tubercidin in die 45S-RNS ermöglicht zwar bis zu einem gewissen Grad noch einen Umbau in 32S-RNS, ein weiteres Processing zur Bildung von 28S- und 18S-RNS findet jedoch aufgrund von Konformationsänderungen der 45S- und 32S-RNS nicht mehr statt. Toyocamycin und 5-Azacytidin, ebenfalls Adenosinanaloga, zeigten die gleichen Auswirkungen auf die Bildung von ribosomaler RNS in Novikoff-Zellen.

Eine selektive Inhibition der r-RNS und t-RNS durch nicht vollständig hemmende Konzentrationen des Adenosinanalogen Cordycepin haben Delseny et al. (1975) bei keimenden Rettichsamen festgestellt; die noch vorhandene Radioaktivität im Bereich von 25S-10S-RNS schreiben sie einigen während ihrer Entstehung vorzeitig abgebrochenen r-RNS-Ketten oder vollständigen Molekülen zu, deren Synthese für den Hemmstoff nicht mehr sensitiv war. Cordycepin und Toyocamycin hemmen bei niedrigen Konzentrationen in *Physarum polycephalum* ebenfalls überwiegend die 26S- und 19S-RNS-Synthese; ebenso wird aber die Bildung der 5S-RNS, und in noch größerem Ausmaße die der 4S-RNS reduziert. Eine Produktion von r-RNS-Vorstufen hingegen kann auch in diesem Organismus nachgewiesen werden (Fouquet et al., 1975).

Obwohl die Hemmung des Einbaus von ^{14}C -Uridin in TCA-unlösliches Mycel und isolierte Nucleinsäuren durch die RNS-Syntheseinhibitoren überzeugend nachgewiesen werden konnte, besteht über die zugrundeliegende Ursache noch einige Unklarheit. Es kann nämlich nicht zweifelsfrei entschieden werden, ob tatsächlich durch die Hemmstoffe die RNS-Synthese blockiert wird und damit zu einer Hemmung des Einbaus entsprechender Vorstufen führt, oder ob nicht die Inhibition der Aufnahme markierter Substanzen einen Abbruch der Nucleinsäurebildung vortäuscht; *Fusarium* ist nämlich nicht auf die Zufuhr von Nucleinsäurebausteinen von außen angewiesen. Gegen die zweite Interpretation spricht allerdings sowohl die unterschiedliche Wirkung der beiden Inhibitoren auf einzelne RNS-Arten (siehe Abb.20) als auch die Tatsache, daß durch ein genügend hohes Angebot an Adenosin eine Hemmung der Nucleinsäuresynthese durch das Analogon Tubercidin aufgehoben werden konnte; ein konträrer Einfluß auf die Aufnahme der beiden Nucleoside Uridin und Adenosin wäre kaum verständlich. Zudem wird die Annahme eines direkten Einflusses von Tubercidin auf den RNS-Stoffwechsel noch dadurch bestärkt, daß auch die Carotinoidsynthese nach einer Vorinkubation mit Adenosin selbst bei erhöhten Tubercidinkonzentrationen nicht beeinträchtigt wird. Zieht man die klare Abhängigkeit der Wirkung auf die Farbstoffbildung vom Zeitpunkt der Inhibitorzugabe mit in Betracht, so ist unter den normalen Inkubationsbedingungen ein Ersatz des Adenins durch das Analogon während der RNS-Synthese ziemlich sicher.

Ähnliche Überlegungen betreffen auch die mit Cycloheximid erzielten Resultate. So konnten Timberlake and Griffin (1973) im Wasserpilz *Achlya* bei Zugabe von Cycloheximid eine sofortige Hemmung der Aufnahme von Prolin nachweisen, die kaum durch eine augenblickliche Hemmung der Proteinsynthese erklärt werden kann. Hunter et al. (1973) stellten

bei ihren Untersuchungen an *Penicillium chrysogenum* ebenfalls einen sofortigen Hemmeffekt auf den Transport von L-Leucin durch Cycloheximid fest. Evans (1971) hingegen konnte bei seinen Experimenten über den Membrantransport in *Euglena* zeigen, daß Phenylalanin- und Leucinaufnahme zwar durch Cycloheximid beeinträchtigt werden, der Einbau dieser Aminosäuren in Proteine jedoch erheblich stärker gehemmt wird. Eine eindeutige Entscheidung darüber, ob in unserem System unter Cycloheximid die Hemmung des Einbaus von ^{14}C -Leucin in Proteine durch eine defekte Synthese oder durch eine Wirkung des Hemmstoffs auf die Aufnahme der radioaktiven Vorstufe ins Mycel hervorgerufen wird, kann deshalb vorläufig nicht getroffen werden. Nachdem aber - wie bereits erwähnt - der Pilz nicht auf eine Zufuhr von Vorstufen der Nucleinsäuren und der Proteine von außen angewiesen ist, wäre eine Hemmung der Carotinoidsynthese durch die Inhibitoren dann nicht ohne weiteres verständlich, wenn diese nur die Aufnahme der Bausteine nicht aber die Synthese der Zellbestandteile hemmen würden.

Abgesehen von diesen Vorbehalten sprechen die vorliegenden Ergebnisse für die Spezifität von Distamycin und Tubercidin als Hemmstoffe der Nucleinsäuresynthese. Der Abbruch der Proteinsynthese als Folge einer totalen Blockierung der Nucleinsäurebildung könnte allerdings implizieren, daß die RNS-Syntheseinhibitoren die Carotinoidsynthese nicht durch die Hemmung der RNS- sondern ebenso wie Cycloheximid durch die der Proteinbildung beeinflussen. Dies würde bedeuten, daß die Photoregulation nicht auf der Ebene der Transkription erfolgen muß, sondern bei post-transkriptionalen Vorgängen angreift - eine Ansicht, die H. Smith im Gegensatz zur Mohr'schen Genderepression vertritt (Diskussion siehe Smith, 1974). Diese Erklärungsmöglichkeit kann aber für den vorliegenden Fall der lichtinduzierten Carotinoidsynthese

bei *Fusarium* aus folgenden Gründen nicht zutreffen:
Während die für den Nachweis der Spezifität der Hemmung durch die RNS-Syntheseinhibitoren verwendeten hohen Konzentrationen von Distamycin und Tubercidin nach ca. 30 min auch die Proteinsynthese vollständig hemmen, wird durch die niedrigere Konzentration von Distamycin, die zwar die Farbstoffbildung blockiert, die Proteinsynthese praktisch nicht beeinflußt. Die in Abschnitt I und III dargestellten Versuche wurden nun aber ausnahmslos mit der zuletzt erwähnten Distamycinkonzentration durchgeführt, also wohl bei nahezu intakter Proteinsynthese; die Wirkung von Distamycin auf die Carotinoidsynthese kann demnach nur über eine Hemmung der Nucleinsäurebildung verstanden werden. Dafür bedarf es nun allerdings einer zusätzlichen Erläuterung des zunächst überraschenden Ergebnisses, daß bei dieser Konzentration auch die RNS-Synthese nur zu ca. 20-30 % beeinträchtigt ist, eine nur mäßige Hemmung der RNS-Bildung also zu einer vollständigen Blockierung der Carotinoidsynthese führt. Dies könnte durch die Annahme erklärt werden, daß die lichtinduzierte Synthese von m-RNS für die carotinoidbildenden Enzyme durch Distamycin viel stärker gehemmt wird als die Synthese der übrigen RNS-Spezies; dafür, daß diese Annahme nicht rein hypothetisch ist, kann der Befund angeführt werden (Abb.20), daß Distamycin in höherer Konzentration die Bildung der verschiedenen RNS-Arten unterschiedlich hemmt.

Der Vergleich der Wirkung von Distamycin und Cycloheximid auf die Bildung der einzelnen Carotinoide (Tab.11 bzw. Abb. 25 und 26) brachte schließlich weitere Hinweise auf eine Neusynthese von Nucleinsäuren und Enzymen nach Lichtinduktion. Durch Distamycin wird die Synthese der einzelnen Farbstoffe, als Maß für die carotinoidbildenden Enzyme, in derselben zeitlichen Sequenz gehemmt wie durch Cycloheximid, wobei jedoch zu den jeweiligen Zeitpunkten die Hemmung durch

den Proteinsyntheseinhibitor immer stärker ist; daß zudem die Synthese der im Biosyntheseweg weiter "vorne" liegenden Pigmente bei späterer Applikation des RNS-Synthesehemmstoffes weniger stark beeinträchtigt werden als die der Endprodukte, kann als Indiz für eine sequentielle Transkription der zugrundeliegenden Information angesehen werden. Die letztere Aussage gewinnt besonders dadurch an Wahrscheinlichkeit, daß - wie bereits oben erwähnt - Distamycin in der hierbei angewandten Konzentration die Proteinsynthese praktisch nicht hemmt. Eine sequentielle Transkription als Folge der Lichtinduktion ließe nämlich trotz einer koordinierten Induktion (Lang und Rau, 1972) Enzyme und Carotinoide in einer kurzen zeitlichen Verschiebung erscheinen. Alpers und Tomkins (1965, 1966) konnten einen derartigen Induktionsmechanismus in *E. coli* nachweisen: Bei Zugabe eines Induktors werden die ersten Enzyme des lac-operons schon durch Translation gebildet, während die Transkription noch andauert. Für den Nachweis eines "Carotinoid-Operons", wie es von Rau (1975) in Anlehnung an das "PAL-Operon" (Zucker, 1972) diskutiert wird, bedarf es aber sicher noch zahlreicher weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassung

1. Als Regulationsmechanismus für lichtinduzierte Synthesen in Pflanzen wird vielfach eine differentielle Genaktivierung angenommen, obwohl es bisher noch nicht gelungen ist, die Bildung einer spezifischen m-RNS durch die Photoinduktion zweifelsfrei nachzuweisen. Andererseits wird aufgrund von schnellen, durch Phytochrom gesteuerten Reaktionen, die eher für eine Regulation der Enzymaktivität als der Enzymsynthese sprechen, eine Änderung von Membraneigenschaften für den zugrundeliegenden Mechanismus diskutiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Hinweise dafür zu finden, welche der beiden Möglichkeiten bei der Photoinduktion der Carotinoidsynthese von *Fusarium aquaeductuum* verwirklicht sein könnte.

2. Zunächst wurde überprüft, ob die permeabilitätsändernde Substanz Acetylcholin in Verbindung mit dem Cholinesterasehemmstoff Eserin eine Lichtinduktion der Carotinoidsynthese ersetzen kann. Acetylcholin war jedoch in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} M bis 5×10^{-2} M - selbst in Kombination mit Eserin - weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen in der Lage, in dem im Dunkeln gehaltenen Pilzmycel eine Carotinoidsynthese auszulösen. Die Lichtinduktion kann also nicht durch Applikation von Acetylcholin ersetzt werden.

3. Weiteren Aufschluß über den beteiligten Induktionsmechanismus sollte uns deshalb die Anwendung von RNS-Syntheseinhibitoren geben, die die Carotinoidsynthese selektiv zu blockieren vermögen. Um jedoch auf diesem indirekten Weg gesicherte Aussagen machen zu können, war der Nachweis der Spezifität der Wirkung solcher Hemmstoffe notwendig und nimmt daher in der vorliegenden Arbeit einen breiten Raum ein.

4. Aus der Vielzahl der untersuchten Hemmstoffe erwiesen sich nur Distamycin und Tubercidin in einem für den Pilzorganismus noch verträglichen Konzentrationsbereich auf die lichtinduzierte Farbstoffbildung selektiv wirksam. Durch Vorinkubation mit Adenosin wird der Hemmeffekt des Antimetaboliten Tubercidin aufgehoben.

5. Distamycin in der Konzentration 3×10^{-4} M und Tubercidin in der Konzentration 10^{-4} M hemmen die lichtinduzierte Carotinoidsynthese dann praktisch vollständig, wenn sie dem Pilzmycel einige Zeit vor der Belichtung zugesetzt werden. Die Hemmung nimmt mit zunehmendem Abstand der Applikation vom Belichtungsbeginn ab; im Vergleich zu dem Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid ist diese Abnahme mindestens in den ersten 60 min nach Belichtung wesentlich rascher.

6. Der Einbau von radioaktiv markiertem Uridin in TCA-unlösliches Pilzmaterial bzw. in isolierte Nucleinsäuren wird durch Distamycin und Tubercidin innerhalb von 10 min nahezu vollständig gehemmt, während der Einbau von markiertem Leucin in das TCA-unlösliche Mycel bzw. in die isolierten Proteine erst nach 30 min blockiert wird. Cycloheximid dagegen hemmt den Leucineinbau wesentlich schneller als den Uridineinbau.

7. Bei der Bestimmung der Nucleinsäuremenge mit Hilfe des OD_{260}/OD_{280} -Wertes erwies sich SAS im Extraktionsmedium als ungeeignet, weil das Absorptionsmaximum dieser Substanz in einem ähnlichen Wellenlängenbereich liegt, wie das des Nucleinsäureextraktes. Mittels entsprechender Eichkurven konnte die Verunreinigung jedoch rechnerisch eliminiert werden.

8. Der Einfluß von Distamycin und Tubercidin auf einzelne RNS-Fractionen verdeutlicht insbesondere, daß durch die Inhibitoren primär die Neusynthese von funktionsfähigen Nucleinsäuren unterbunden wird. So wird durch Distamycin die Bildung von r-RNS-Vorstufen vollkommen unterbunden, während unter Tubercidin kein "processing" bereits gebildeter Vorstufen mehr stattfindet.

9. Zur Untersuchung der Wirkung von Distamycin und Cycloheximid auf die Synthese der einzelnen Carotinoide wurde das Pilzmycel mit radioaktiver MVA inkubiert. Durch entsprechende Aufarbeitung konnten Sterine, Squalen und Carotinoide säulen- und dünnschichtchromatographisch getrennt und ihre Radioaktivität bestimmt werden.

10. Von den lipophilen Substanzen des Gesamtextraktes wurden vor allem die Sterine besonders stark markiert. Eine lichtbedingte Abnahme der Sterinsynthese und der des Squalens konnte auf eine entsprechende Zunahme der Carotinoidsynthese zurückgeführt werden. Eine deutliche Hemmung der Sterinsynthese durch Cycloheximid legt die Vermutung nahe, daß konstitutive Enzyme des Sterinbiosyntheseweges einem hohen turn-over unterliegen.

11. Distamycin hemmt die Synthese jedes einzelnen Pigmentes umso weniger, je später der Inhibitor nach Belichtungsbeginn appliziert wird; der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid hemmt zu den entsprechenden Zeiten jeweils erheblich stärker als der Transkriptionshemmstoff. Der Grad der Hemmung ist bei beiden Inhibitoren zu jedem Zeitpunkt umso stärker, je weiter "hinten" das jeweilige Pigment im Biosyntheseweg liegt.

12. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß das Licht auf die Transkriptionsebene wirkt. Eine sequentielle Transkription der Information für die carotinoidbildenden Enzyme wird im Vergleich zu verschiedenen Hypothesen über den Mechanismus von Photoregulationen diskutiert.

Literaturverzeichnis

- Alpers, H.D. and Tomkins, G.M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.
53, 797 (1965).
- Alpers, D.H. and Tomkins, G.M.: J. biol. Chem. 241, 4434
(1966).
- Acs, G., Reich, E. and Mori, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.
52, 493 (1964).
- Acs, G. and Reich, E.: in Antibiotics I, Mechanism of Action;
ed. Gottlieb, D. and Shaw, P.D., Springer Verlag
Berlin-Heidelberg-New York; 494 (1967).
- Batra, P.P. and Rilling, H C.: Arch. Biochem. 107, 485
(1964).
- Batra, P.P. and Storms, L.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 33,
820 (1968).
- Batra, P.P.: in Photophysiology (ed. A.C.Giese), Bd. VI, 47
(1971).
- Bieth, J., Wassermann, N., Vratsanos, S.M. and Erlanger, B.F.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 66, 850 (1970).
- Bindl, E.: Dissertation, Universität München (1968).
- Bindl, E., Lang, W. und Rau, W.: Planta 94, 156 (1970).
- Briggs, W.R. and Rice, H.V.: Ann. Rev. Plant Physiol. 23,
293 (1972).
- Britton, G. and Goodwin, T.W.: in Methods in Enzymology,
XVIII C, Vitamins and Coenzymes, ed. Mc Cormick,
D.B. and Wright, L.D., Academic Press, London,
683 (1971).
- Burchard, R.P. and Hendricks, J.: J. Bacteriol. 97, 1165
(1969).

- Chandra, P., Zimmer, Ch. and Thrum, H.: FEBS Lett. 7, 90 (1970).
- Chen, H.R.: Science, N.Y., 159, 631 (1968).
- Claes, H.: in Biochemistry of Chloroplasts, Vol. II, ed. T.W. Goodwin, Academic Press, London, 441 (1967).
- Dahnke, H.-G.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1555 (1975).
- Davies, B.H.: Ber. Deutsch. Bot. Ges. 88, 7 (1975).
- Delseny, M., Peralta, M.T. and Guitton, Y.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 1278 (1975).
- Dittes, H. und Mohr, H.: Z. Naturforsch. 25b, 708 (1970).
- Drumm, H.: Brüning, K. and Mohr, H.: Planta 106, 259 (1972).
- Ellem, K.A.O. and Sheridan, J.W.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 505 (1964).
- Evans, W.R.: J. Biol. Chem. 246, 6144 (1971).
- Ferrari, T.E. and Widholm, J.M.: Anal. Biochem. 56, 346 (1973).
- Feulner, J.: Dissertation, Universität München (1969).
- Florey, E.: in Lehrbuch der Tierphysiologie, Neurochemie und Neuropharmakologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 524 (1970).
- Fondeville, J.C., Borthwick, H.A. and Hendricks, S.B.: Planta 69, 357 (1966).
- Fouquet, H., Wick, A. Böhme, R., Sauer, H.W. and Scheller, K.: Arch. Biochem. Biophys. 168, 273 (1975).
- Francki, R.I.B., Zeitlin, M. and Jensen, R.G.: Plant Physiol. 48, 14 (1971).
- Fraser, R.S.S.: Eur. J. Biochem. 50, 529 (1975).
- Gianani, L., Geminiani, I. and Cocucci, S.M.: Ann. Micr. 22, 85 (1972).

- Goad, L.J. and Goodwin, T.W.: *Biochem. J.* 99, 735 (1966).
- Goodwin, T.W., Thomas, D.M., Harries, R.J. and Kirk, J.T.O.:
T. Kiemi, Bergv., *Metallurgi* 26 (1966).
- Goodwin, T.W.: in *The Biochemistry of Chloroplasts*, ed.
Goodwin, T.W., Vol. 2, Academic Press, London,
721 (1967).
- Graebe, J.E.: *Phytochem.* 7, 2003 (1968).
- Gressel, J., Srausbauch, L. and Galun, E.: *Nature* 232,
648 (1971).
- Harding, R.W. and Mitchell, H.K.: *Arch. Biochem. Biophys.*
128, 814 (1968).
- Harding, R.W., Huang, P.C. and Mitchell, H.K.: *Arch. Biochem.*
Biophys. 129, 696 (1969).
- Harding, R.W.: *Plant Physiol.* 54, 142 (1974).
- Harel, E. and Bogorad, L.: *Plant Physiol.* 51, 10 (1973).
- Hartmann, K.M.: *Planta* 101, 159 (1971).
- Haupt, W.: *Planta* 53, 484 (1959).
- Hennig, W., Kunz, W., Snieders, B. und Williams, K.: *Z.*
Naturforsch. 26b, 235 (1971).
- Howes, C.D., Batra, P.P. and Blakeley, C.F.: *Biochim.*
Biophys. Acta 189, 298 (1969).
- Hunter, D.R., Norberg, C.L. and Segel, I.H.: *J. Bacteriol.*
114, 956 (1973).
- Ingle, J.: *Plant Physiol.* 43, 1850 (1968).
- Jaffe, M.J.: *Plant Physiol.* 46, 768 (1970).
- Javor, G.T.: *J. Bact.* 120, 282 (1974).
- Jensen, S.L.: *Phytochem.* 4, 925 (1965).
- Kandeler, R.: *Fortschr. Bot.* 34, 211 (1972).

- Kasemir, H. und Mohr, H.: Plant Physiol. 49 (1972).
- Key, J.L.: Plant Physiol. 41, 1257 (1966).
- Kirby, K.S.: Biochem. J. 96, 266 (1965).
- Krey, A.K. and Hahn, F.E.: FEBS Lett. 10, 175 (1970).
- Kushwaha, S., Subbaryan, C., Beeler, D.B. and Porter, J.W.:
J. Biol. Chem. 243, 3635 (1969).
- Kushwaha, S., Suzue, G., Subbarayan, C. and Porter, J.W.:
J. Biol. Chem. 245, 4708 (1970).
- Lang, W.: Dissertation, Universität München (1969).
- Lang, W. und Rau, W.: Planta 106, 345 (1972).
- Lang-Feulner, J. and Rau, W.: Photochem. Photobiol. 21,
179 (1975).
- Lange, H., Bienger, I. und Mohr, H.: Planta 76, 359 (1967).
- Loening, U.E.: Biochem. J. 102, 251 (1967).
- Lovett, J.S. and Haselby, J.A.: Arch. Microbiol. 80, 191
(1971).
- Mandell, J.D. and Hershey, A.D.: Anal. Biochem. 1, 66
(1960).
- Mann, J.D.: Bioscience 15, 464 (1965).
- Mc Cullough, W. and John, P.C.L.: New Phytol. 71, 829 (1972).
- Mende, W.: Dissertation, Universität München (1976).
- Mitzka, U.: Diplomarbeit, Universität München (1973).
- Mohr, H.: Photochem. Photobiol. 5, 469 (1966).
- Mohr, H. und Senf, R.: Planta 71, 195 (1966).
- Mohr, H. und Bienger, I.: Planta 75, 180 (1967).
- Mohr, H.: Lectures on photomorphogenesis. Springer Verlag;
Berlin-Heidelberg-New York (1972).
- Morimoto, H., Ferchmin, P.A. and Bennet, E.L.: Anal. Biochem.
62, 436 (1974).

- Morris, I.: J. Exp. Bot. 18, 54 (1967).
- Mummary, R.S. and Valadon, L.R.G.: Physiol. Plant. 28, 254 (1973).
- Oelze-Karow, H., Schopfer, P. und Mohr, H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 65, 51 (1970).
- Osterburg, H.H., Allen, J.K. and Finch, C.E.: Biochem. J. 147, 367 (1975).
- Puschendorf, B. und Grunicke, H.: FEBS Lett. 4, 355 (1969).
- Puschendorf, B., Becher, H., Böhländt, D. and Grunicke, H.: Eur. J. Biochem. 49, 531 (1974).
- Qureshi, A.A., Andrewes, A.G., Qureshi, N. and Porter, J.W.: Arch. Biochem. Biophys. 162, 93 (1974).
- Rau, W.: Planta 59, 123 (1962).
- Rau, W.: Planta 72, 14 (1967a).
- Rau, W.: Planta 74, 263 (1967b).
- Rau, W., Planta 84, 30 (1969).
- Rau, W.: Ber. Deutsch. Bot. Ges. 88, 45 (1975).
- Rau, W.: Pure Appl. Chem. 47, 237 (1976).
- Rau, W. and Rau-Hund, A.: Planta 136, 49 (1977).
- Reichman, M. and Penman, S.: Biochim. Biophys. Acta 324, 282 (1973).
- Rilling, H.C.: Biochim. Biophys. Acta 79, 464 (1964).
- Ruet, A., Bouhet, J.-C., Buhler, J.-M. and Sentenac, A.: Biochem. 14, 4651 (1975).
- Saleh, F.K.: Phd. Diss., New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico, USA (1970).
- Sakai, H. and Kihara, H.K.: Biochim. Biophys. Acta 157, 630 (1968).

- Schopfer, P.: Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 271 (1973).
- Schnarrenberger, C. and Mohr, H.: Planta 94, 296 (1970).
- Seviour, R.S. and Cordner, R.C.: J. Gen. Microbiol. 77, 403 (1973).
- Schrott, E.L.: Dissertation, Universität München (1973).
- Schrott, E.L. and Rau, W.: Planta 136, 46 (1977).
- Solymosy, F., Fedoracsak, I., Gulyas, A., Farkas, G.L. and Ehrenberg, L.: Eur. J. Biochem. 5, 520 (1968).
- Smith, H.: in Phytochrome and Photomorphogenesis; Mc Graw-Hill Book Company (UK) Limited, England (1974).
- Subden, R.E. and Bobowski, G.: Experientia 29, 965 (1973).
- Timberlake, W.E. and Griffin, D.H.: Biochem. Biophys. Res. Com. 54, 216 (1973).
- Theimer, R.R. und Rau, W.: Planta 92, 129 (1970).
- Toennessen, T. and Friesen, J.D.: J. Bact. 115, 889 (1973).
- Valadon, L.R.G. and Mummery, R.: Microbiol. 4, 227 (1971).
- Valadon, L.R.G.: Physiol. Plant. 32, 233 (1974).
- Valadon, L.R.G.: Travis, R.L. and Key, J.L.: Physiol. Plant. 34, 196 (1975).
- Wacker, A., Bauer, B. und Träger, L.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 320 (1970).
- Weeks, O.B., Saleh, F.K., Wirahadikusumah, M. and Berry, R.A.: Pure Appl. Chem. 35, 63 (1973).
- Weiss, J.W.: Phd. Diss., University of Wisconsin-Madison, USA (1974).
- Yuyama, S. and Zimmermann, A.M.: Exp. Cell. Res. 71, 193 (1972).
- Zalokar, M.: Arch. Biochem. Biophys. 50, 71 (1954).
- Zalokar, M.: Arch. Biochem. Biophys. 56, 318 (1955).

Zimmer, Ch. and Luck, G.: FEBS Lett. 10, 339 (1970).

Zimmer, Ch., Puschendorf, B., Grunicke, H., Chandra, P. and
Venner, H.: Eur. J. Biochem. 21, 269 (1971).

Zimmer, Ch. and Reinert, K.E.: J. Mol. Biol. 58, 329 (1971).

Zucker, M.: Ann. Rev. Plant. Physiol. 23, 133 (1972).

Lebenslauf

Marianne Jochum, geboren am 7.10.1946 in Kahlhof/Feldkirchen
geb. Felbermeir als zweites von drei Kindern der Landwirts-
eheleute Franz und Maria Felbermeir; seit
Oktober 1975 verheiratet mit Dipl.Math.
Peter Jochum.

Schulbildung 1953-1958 Volksschule in Wagenhofen
1958-1967 Mathematisch-Naturwissenschaftl.
Gymnasium in Neuburg a.d.Donau

Studium 1967-1971 Studium der Biologie und Chemie
an der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität München
1971 (Aug.-Nov.) Staatsexamen in Biologie
und Chemie für das Höhere Lehr-
amt an den Gymnasien

Promotion 1971 (Dez.) Beginn der Dissertationsarbeit
bei Prof.Dr.W.Rau (Botanisches
Institut)

Berufstätigkeit 1973-1974 wissenschaftliche Hilfskraft am
Bot.Inst. der Univers.München
1974 (Okt.) - 1976 (Jan.) Verwalterin einer
wiss.Assistentenstelle am selben
Institut
1976-1978 Vorbereitungsdienst für das Lehr-
amt an den Gymnasien am Pädagogi-
schen Seminar des Rupprecht-
Gymnasiums München.

